



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO
GENE HLA-G EM PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE B

ANDRÉ MARTINS FONTES

VITÓRIA
2016



André Martins Fontes

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO GENE HLA-G EM PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE B

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Trés Pancoto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Cazerta Farro

VITÓRIA
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F682e Fontes, André Martins, 1989 -
 Estudo de polimorfismo da região 3' não traduzida do gene
 HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B / André Martins
 Fontes – 2016.
 123 f. : il.

Orientador: João Alexandre Três Pancoto.
Coorientador: Ana Paula Cazerta Farro.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Hepatite B. 2. Epidemiologia. 3. Mapeamento Geográfico.
4. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. I. Pancoto, João
Alexandre Três. II. Farro, Ana Paula Cazerta. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61

A Juliana amor e razão da minha vida

Maria e José Luiz, que me deram a
vida e a oportunidade de ser quem eu
sou

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria que abdicou muita coisa para se dedicar a minha educação, nunca deixando faltar nada durante esses longos 6 anos e alguns meses de estudo até aqui.

À minha noiva Juliana por estar sempre do meu lado mesmo nos momentos difíceis, me dando suporte e me transmitindo amor principalmente que é a base de tudo.

Ao meu irmão pelo exemplo de vida e garra. Sempre mostrando que é possível alcançar nossos sonhos mesmo na dificuldade.

À minha madrinha Marli, por sempre me incentivar para prosseguir com os estudos.

À Deus pela vida e pelo conhecimento, sou eternamente grato.

Ao Prof. Dr. João Alexandre Trés Pancoto por compartilhar seus conhecimentos e acreditar desde o início na minha capacidade aceitando me orientar.

À Prof. Ana Paula Cazerta Farro, por sua co-orientação, por ter cedido gentilmente seu laboratório para utilizarmos na fase inicial de nosso projeto em São Mateus.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Randow de Freitas por auxiliar no estudo epidemiológico dos municípios do Norte do Espírito Santo passando seu conhecimento sobre análises de georreferenciamento.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Andrade de Souza por sempre me auxiliar, desde a época de graduação, com seu conhecimento. Minha sincera gratidão por todos esses anos.

Ao Pós-Doutor Gustavo Martelli Palomino, por todo auxílio durante as fases finais do meu projeto e por ter aceito participar da banca avaliadora desse trabalho.

À Prof. Dr. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem, pelo apoio desde o início do meu projeto, cedendo toda a sua estrutura para realizar meu estudo. Além ter aceito participar da avaliação desse trabalho.

À Prof. Dr. Carmen Lúcia Bassi Branco por ter cedido gentilmente as amostras dos pacientes portadores de Hepatite B crônica do município de Cuiabá, sendo um fator primordial para a análise dos polimorfismos gênicos.

Às alunas Juliana Santa Ardisson e Isabella Arpini por terem iniciado a parte epidemiológica no Trabalho de Conclusão de Curso sob orientação do Prof. Dr. João Alexandre Trés Pancoto e por terem me cedido gentilmente alguns dados para o início do projeto no municípios do norte do Espírito Santo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e a CAPES/CNPq pelo apoio financeiro.

À Secretaria Estadual de Saúde e Farmácia Cidadã do Estado do Espírito Santo e a Secretaria Municipal de Saúde e Centro de Testagem e Aconselhamento do

município do Espírito Santo por todo apoio para as coleta de dados e amostras biológicas.

Ao Marllus, à Ivanilda e Marta, à equipe de enfermagem, às meninas da recepção e à Doutora Emanuely do Centro Regional de Especialidades de São Mateus por me apoiarem nas buscas dos prontuários e nas coletas de amostras biológicas para a realização do projeto.

À farmacêutica Larissa da farmácia Cidadã que me acolheu nos momentos iniciais do projeto dando todo apoio e suporte com os pacientes.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade Estadual de São Paulo pelo apoio e pela realização do sequenciamento das minhas amostras.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), por viabilizar a realização das dosagens bioquímicas deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por contribuírem na minha formação profissional.

Às minhas companheiras de laboratório Natalia e Djane pela ajuda nos experimentos.

As novas amigas formadas nesse período de 2 anos e alguns meses.

Aos inseparáveis amigos da graduação Fabrício e Gusson por toda amizade e companheirismo durante os 4 anos e meio vividos em São Mateus como aluno.

Aos meus alunos do curso de farmácia e enfermagem no CEUNES/UFES por compreenderem minhas necessidades nesse momento final do mestrado e por serem sempre amigos e companheiros.

Aos meus amigos de Cachoeiro de Itapemirim, Dinho, Jonny, Dudu, Dudu Sant'anna, Bruninho, Paulão e Betty, por sempre estarem do meu lado me dando apoio e amizade.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca vencer obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo já tiveram contato com o vírus da Hepatite B (VHB), sendo que 240 milhões se tornaram portadores crônicos. A hepatite B constitui um tipo de doença no qual os mecanismos patogênicos ainda não estão completamente esclarecidos, sendo que a mesma pode evoluir para forma crônica e promover manifestações clínicas como cirrose hepática e hepatocarcinoma celular, levando a um grande número de óbitos anualmente. Considerando as alterações no sistema imunológico promovidas pelo VHB, realizou-se uma análise de georreferenciamento e levantamento epidemiológico, nos municípios da região norte do Espírito Santo, com objetivo inicial de caracterizar o número de indivíduos infectados pelo VHB. Além disso, utilizou-se esta análise inicial como base de avaliação de polimorfismos de genes que podem estar relacionados com a patogenia da doença, incluindo genes situados dentro do MHC como região 3' não traduzida do HLA-G (presença ou ausência 14 pares de base (pb), + 3001 C/T, + 3003 C/T, + 3010C/G, + 3027 A/C, 3035 C/T, + 3142 C/G, + 3187 A/G, + 3196 C/T). A georreferenciação e a epidemiologia mostraram que o município de São Mateus apresentou o maior número de indivíduos infectados pelo VHB, seguido das cidades de Pedro Canário e Jaguaré. A população com idade entre 20-59 anos, do sexo feminino foram as mais acometidas pela doença, onde as principais formas de transmissão ocorreram através do uso de medicamentos injetáveis e tratamento dentário. Os principais medicamentos utilizados no tratamento foram Tenofovir e Entecavir. Dentre os sítios polimórficos estudados em indivíduos do norte do Espírito Santo e do estado do Mato Grosso, apenas a frequência alélica +3196G [$p < 0,0130$; (OR = 1,540; IC 95% = 1,097 a 2,162) e a frequência genotípica Del/Ins de 14-pb [$p < 0,0194$; (OR = 1,645; IC 95%=1,101 a 2,458)] foram mais frequentes nos pacientes com Hepatite B em relação aos controles, podendo estar relacionado com o favorecimento do escape viral e progressão da infecção. Em relação aos genótipos +3003 C/T, + 3003 T/T e +3196 C/C, estes foram mais frequentes nos controles em relação aos pacientes e geralmente são associados como alvo de microRNAs (mirRNA) sendo relacionados com a degradação de RNAm, resultando na baixa produção das isoformas solúveis e de membrana de HLA-G. Em conjunto, considerando os resultados encontrados no presente estudo, observa-se que na região norte há muitos pacientes infectados

com VHB, sendo maioria do sexo feminino. Fato que pode ser associado a baixa adesão ao tratamento e a forma de contato relacionada com o não cumprimento das normas de biossegurança. A avaliação dos polimorfismos gênicos na população estudada, sugere que os mesmos possuem genótipos favoráveis a alta produção de HLA-G e dessa maneira esta molécula imunoregulatória pode estar influenciando no desenvolvimento da forma crônica da Hepatite B e no surgimento de possíveis complicações desta patologia como cirrose hepática e hepatocarcinoma celular.

Palavra-chave: Hepatite B, Epidemiologia, Georreferenciamento, HLA-G, Polimorfismo de 14-pb, Polimorfismo de Nucleotideo Único.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) estimates that about 2 billion people worldwide have had contact with the hepatitis B virus (HBV), and 240 million to become chronic carriers. Hepatitis B is a type of disease in which the pathogenetic mechanisms are not yet fully understood, and it can evolve into chronic form and promote clinical manifestations such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma, leading to a large number of deaths annually. Considering the changes in the immune system promoted by HBV, we use a data processing through geographic information system (GIS) technology and epidemiological analysis, in the cities of the northern region of the Espírito Santo State, with the initial objective to characterize the number of individuals infected with HBV. In addition, we used this initial analysis as a basis for evaluation of gene polymorphisms that may be associated with the pathogenesis of the disease, including situated genes within the MHC as the 3' untranslated region of the HLA-G (presence or absence of 14 pairs base, + 3001 C/T, + 3003 C/T, + 3010C/G, + 3027 A/C, + 3035 C/T, + 3142 C/G, + 3187 A/G e + 3196 C/T). A GIS and epidemiological analysis showed that São Mateus had the largest number of individuals infected with HBV, followed by the cities of Pedro Canario and Jaguaré. The population aged 20-59 years, female sex, were the most affected by the disease, where the main forms of transmission occurred through the use of injectable drugs and dental care. The main drugs used in the treatment were Tenofovir and Entecavir. Among the polymorphic sites studied in individuals of the northern state Espírito Santo and the state of Mato Grosso, only the frequency allelic +3196G [p <0.0130; (OR = 1.540; 95% CI = 1.097 to 2.162)] and frequency genotypic Del/Ins 14-bp [p <0.0194; (OR = 1.645; 95% CI = 1.101 to 2.458)] were more frequent in patients with hepatitis B compared to controls, which may be related to the encouragement of viral escape and progression of infection. Regarding the genotypes +3003C/T, +3003 TT and +3196C/C, these were more frequent in controls compared to patients and are usually associated as microRNAs target (mirRNA) being related to the degradation of mRNA, resulting in low production of soluble and membrane HLA-G isoforms. Together, considering the results found in our study, it is observed that in the north there are many patients infected with HBV, and most of the female, which may be associated with poor adherence to treatment and due to low socio-economic level, sexual transmission, and dental/medical/surgical failures by

the standards of biosecurity procedures. Evaluation of genetic polymorphisms in the population suggests that they have genotypes favorable to high production of HLA-G and thus this immunoregulatory molecule could be influencing the development of the chronic form of hepatitis B and the emergence of possible complications of this disease such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Keyword: Hepatitis B, Epidemiology, Georeferencing, 14-pb Polymorphism, Single Nucleotide Polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Aminoácido Adenina
ALT- Aspartato Transaminase
ANTI-HBs – Anticorpo para o antígeno de superfície
ANTI-HBc – Anticorpo para o antígeno do core
ANTI-HBe – Anticorpo para o antígeno “e”
AST – Alamina Transaminase
CRE- Centro Regional de Especialidades
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
GM – CSF – Fator Estimulador de colônias de Granulócito-Macrófago
HBcAg – Antígeno do Core do Vírus da Hepatite B
HBeAg – Antígeno “e” do Vírus da Hepatite B
HBsAg – Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HCC – Carcinoma Hepatocelular
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA- Antígeno leucocitário humano
HLA-G- Antígeno leucocitário humano
HLA-G1- Antígeno leucocitário humano isoforma 1
HLA-G2- Antígeno leucocitário humano isoforma 2
HLA-G3- Antígeno leucocitário humano isoforma 3
HLA-G4- Antígeno leucocitário humano isoforma 4
HLA-G5- Antígeno leucocitário humano isoforma 5
HLA-G6- Antígeno leucocitário humano isoforma 6
HLA-G7- Antígeno leucocitário humano isoforma 7
HUCAM- Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes
IgG- Imunoglobulina G
IgM- Imunoglobulina M
IL- interleucina
IMGT – Projeto Internacional de Imunogenética
INF- Interferon
INS- Inserção
Kb – Quilo bases
LAV- Lamivudina
LLA- Leucemia linfoblástica aguda
LLC-B - Leucemia linfocítica crônica
LMA- Leucemia mielóide aguda
MDS- Técnica não métrica de escalonamento multidimensional
MiRNA – Micro RNAs
MgCl₂- Cloreto de magnésio
MHC- complexo principal de histocompatibilidade
NA's- Análogos Nucleosídicos Orais
NK- células Natural Killer
PB- pares de bases
PCR- Reação em cadeia polimerase
PNI- Programa Nacional de Imunização

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m- ácido ribonucleico mensageiro

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SM- São Mateus

SNPs – Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

T- aminoácido timina

TDF -Tenofovir disoproxil Fumarato

TGF – Fator de crescimento Tumoral

TH-2- linfócitos T helper-2

TNF- Fator de Necrose Tumoral

U- aminoácido Uracila

UTR – Região não traduzida

UV - Ultravioleta

VHB – Vírus da Hepatite B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização Genômica do HBV	23
Figura 2: Marcadores sorológicos do VHB durante a evolução clínica na fase aguda (A) e na fase crônica (B).	28
Figura 3: Histórico da utilização dos antirretrovirais	31
Figura 4: Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), humano, no braço curto do cromossomo 6.	36
Figura 5: Isoformas do HLA-G produzidas por Splicing alternativo do RNAm primário.	38
Figura 6: Células que expressão HLA-G e células com receptores de HLA-G	43
Figura 7: Gel de poliacrilamida resultante da amplificação do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G e seus possíveis genótipo.....	54
Figura 8: Localização cartográfica dos números de casos proporcionais de Hepatite B nos municípios da região norte do estado do Espírito Santo no período de 2007 a 2013.	57
Figura 9: Non Metric Multidimensional Scaling (MDS) - Similaridade entre os anos correspondentes ao período de 2007 a 2013 nos municípios da região norte do estado do Espírito Santo.	58
Figura 10: Non Metric Multidimensional Scaling (MDS) - Similaridade entre os municípios da região norte do estado do Espírito Santo quanto as notificações no período de 2007 a 2013.	59
Figura 11: Estratificação dos números de notificações de Hepatite B nos municípios com maior percentual de casos na região norte do Espírito Santo no período de 2009 a 2013, * $p = 0.0313$	59
Figura 12: Estratificação por faixa etária dos números de notificações de Hepatite B nos municípios com os maiores percentuais de casos na região norte do Espírito Santo no período de 2007 a 2013, * $p=0.0017$	60
Figura 13: Localização cartográfica dos municípios da região norte que apresentaram os maiores números de casos de Hepatite B estratificados por sexo no período de 2007 a 2013, * $p=0,0106$	61
Figura 14: Dendograma representando as formas de contato da Hepatite B nos municípios da região norte do Espírito Santo no período de 2007 a 2013.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Protocolo de extração de DNA adaptado do método de " <i>Salting out</i> " descrito por Maniatis e Munro (1989).....	51
Quadro 2: Concentrações de reagentes utilizados para a amplificação do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G.	52
Quadro 3: Perfil de ciclagem do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G.....	53
Quadro 4: Condições específicas para eletroforese do produto da amplificação do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G.	53
Quadro 5: Perfil de ciclagem para incubar a reação do produto de PCR com a enzima ExoProStar™ 1 – Step.....	54
Quadro 6: Mix para realização da reação de sequenciamento.	55
Quadro 7: Perfil de ciclagem para reação do mix de sequenciamento.	55
Quadro 8: Protocolo de precipitação do produto da reação de sequenciamento.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil dos pacientes atendidos pelo Centro Regional de Especialidades, Centro de Testagem e Aconselhamento e Farmácia Cidadã do município de São Mateus – Espírito Santo.	63
Tabela 2: Número de casos de Hepatite B de acordo com a forma de evolução da hepatite B nos pacientes do Centro Regional de Especialidades de São Mateus (CRE-SM) a partir do município de residência.	64
Tabela 3: Estratificação de acordo com a carga viral dos níveis de VHB-DNA nos pacientes portadores de Hepatite B em tratamento no CRE-SM de acordo com o município de residência.	64
Tabela 4: Número de indivíduos portadores crônicos atendidos no CRE-SM de acordo com a carga viral e terapia nos municípios da Região norte do Espírito Santo.	65
Tabela 5: Distribuição das frequências alélica e genotípicas do polimorfismo de Deleção/Inserção de 14-pb entre as posições +2961 a +2974 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores Hepatite B crônica (n=195) e indivíduos controles (n=195).	66
Tabela 6: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo de Deleção/Inserção de 14-pb entre as posições +2961 a +2974 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica com cirrose hepática (n=31) ou sem cirrose hepática (n=164).	67
Tabela 7: Distribuição das frequências alélica e genotípica do polimorfismo de Deleção/Inserção de 14-pb entre as posições +2961 a +2974 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica com cirrose hepática (n=31) e controles (n=195).	67
Tabela 8: Frequências alélicas e genotípicas da variação polimórfica de Citosina ou Timina na posição +3003 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores Hepatite B crônica (n=164) e indivíduos controles (n=195).	68
Tabela 9: Frequências alélicas e genotípicas da variação polimórfica de Citosina ou Guanina na posição +3010 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores do Vírus da Hepatite B (n=164) e indivíduos controles (n=195).	69
Tabela 10: Frequências alélicas e genotípicas da variação polimórfica de Citosina ou Adenina na posição +3027 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=164) e indivíduos controles (n=195).	70
Tabela 11: Frequências alélicas e genotípicas da variação polimórfica de Citosina ou Timina na posição +3035 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=164) e indivíduos controles (n=195).	70

Tabela 12: Frequências alélica e genotípica da variação polimórfica de Citosina ou Guanina na posição +3142 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=164) e indivíduos controles (n=195).....71

Tabela 13: Frequências alélicas e genotípicas da variação polimórfica de Adenina ou Guanina na posição +3187 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=161) e indivíduos controles (n=195).....72

Tabela 14: Frequências alélicas e genotípicas da variação polimórfica de Citosina ou Guanina na posição +3196 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=161) e indivíduos controles (n=163).....73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Considerações iniciais	21
1.2 Vírus da Hepatite B	22
1.3 Epidemiologia	25
1.4 Transmissão	26
1.5 Diagnóstico	27
1.6 Prevenção.....	29
1.7 Tratamento	30
1.8 Patogenia da Hepatite B	32
1.8.1 Infecção Aguda	32
1.8.2 Infecção Crônica	32
1.8.3 Imunopatogenicidade	33
1.9 Antígeno Leucocitário Humano - (HLA)	35
1.9.1 Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G)	36
1.9.2 HLA-G e doenças virais	40
1.9.3 HLA-G e Hepatite B.....	41
1.9.4 Regulação da expressão gênica do HLA-G	42
1.9.5 Aplicabilidade clínica do conhecimento sobre HLA-G	45
3. OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo geral.....	48
3.2 Objetivos específicos	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Aspectos éticos.....	49
4.2 Caracterização da amostra.....	49
4.3 Avaliações dos polimorfismos gênicos	51
4.3.1 Extração e quantificação do DNA.....	51
4.3.2 Reação de amplificação do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G.....	52
4.3.3 Gel de eletroforese.....	53
4.3.4. Coloração com nitrato de prata	53
4.3.5. Registro dos resultados.....	54

4.3.6 Sequenciamento da região 3' não traduzida do gene HLA-G	54
4.4 Análises estatísticas	56
5. RESULTADOS	57
5.1 Avaliação epidemiológica preliminar do vírus da Hepatite B na região norte do Espírito Santo.	57
5.2 Estratificações dos casos de Hepatite B no período de 2009 a 2013.....	60
5.3 Avaliação epidemiológica do vírus da Hepatite B na região norte do Espírito Santo no ano de 2014 e 2015.....	62
5.4 Polimorfismos gênicos	65
5.4.1 Análises das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo de Del/Ins de 14 pares de bases na região 3' UTR do gene HLA-G.....	66
5.4.2 Análises das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região 3' UTR do gene HLA-G.....	68
6. DISCUSSÃO	74
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
10. ANEXOS	108
10.1 Parecer do comitê de ética	108
10.1 Artigo publicado na revista Anais da Academia Brasileira de Ciência	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

As doenças infecciosas representam um grande desafio para sobrevivência dos humanos, impulsionando à busca constante de formas eficientes de tratamento, prevenção e controle (GOMES-GOUVÊA, 2014). Entre a diversidade de doenças infecciosas encontram-se as hepatites virais que conduzem a um cenário de elevada morbimortalidade, além de exigir grandes investimentos em terapêutica, como nos casos dos transplantes de fígado (HOU; LIU; GU, 2005; SOUTO et al., 2006).

Nos últimos 50 anos diversos avanços na prevenção e no controle foram constatados, principalmente pelos progressos na identificação dos agentes virais, desenvolvimento de testes laboratoriais específicos, rastreamento dos indivíduos infectados e o surgimento de vacinas protetoras (FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

As hepatites virais apresentam diferentes agentes etiológicos de distribuição universal tendo em comuns achados clínicos, laboratoriais e o hepatotropismo (propensão que vírus tem em infectar os hepatócitos), mas divergem no ponto de vista epidemiológico e quanto sua evolução clínica (FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

Os vírus causadores de hepatite são classificados em A, B, C, D e E, podendo ser agrupados de acordo com as formas de transmissão fecal-oral (vírus A e E) e parenteral (vírus B, C e D) (FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

Dentre os diversos agentes etiológicos das Hepatites Virais, encontra-se o vírus da Hepatite B (VHB), que representa um grande problema de saúde pública entre diversas populações do mundo (FONSECA, 2010; GOMES-GOUVÊA, 2014). Esse vírus infecta as células hepáticas (hepatócitos) para se replicar utilizando seu material genético e consequentemente leva a perda da função normal dessas células (SEEGER; MANSON, 2000; GOMES-GOUVÊA, 2014). Os hepatócitos também sofrem danos em decorrência da resposta imunológica, uma vez que, ao se reconhecer os antígenos virais, células de defesa são recrutadas para destruir e eliminar o vírus (GANEM; PRINCE, 2004; GOMES-GOUVÊA, 2014).

Apesar de existir vacina há cerca de duas décadas, o que gerou um declínio nos números de novos casos em todo mundo (SHOUVAL, 2003; GOMES-GOUVÊA, 2014), a hepatite B continua sendo uma das doenças infecciosas mais comuns

(GOMES-GOUVÊA, 2014). A Organização Mundial de Saúde estima que atualmente cerca de 240 milhões de indivíduos que tiveram contato com o VHB infectaram-se e tornaram-se portadores crônicos (WHO, 2015), isso a um longo prazo pode significar que esses indivíduos podem apresentar complicações clínicas da doença como Cirrose Hepática, Hepatocarcinoma Celular (HCC) e evoluir para o óbito (GOMES-GOUVÊA, 2014).

1.2 Vírus da Hepatite B

O VHB é considerado um membro protótipo da família *Hepadnaviridae* e pertence ao gênero *Orthohepadnavirus*. É caracterizado como vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA) com hepatotropismo, infectando e se replicando nos hepatócitos de mamíferos através da transcrição reversa a partir de ácido ribonucleico (RNA) pré-genômico (MARION, 1988; LEE, 1997; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014; POLLICINO; SAITTA, 2014; YE, 2015).

O virion (partícula viral) ou partícula de Dane é infectante e representa toda a estrutura viral, com 42 nm de diâmetro. A composição dessa estrutura é de DNA viral envolto por um nucleocapsídeo e uma camada externa compondo a proteína de superfície HBs (s de *surface* = superfície) que compõe o antígeno de superfície do VHB (HBsAg). Mais internamente o virion apresenta a proteína HBc (c de *core*) que possui 30 a 34 nm de diâmetro. Estão presentes nessa estrutura o antígeno do core do vírus (HBcAg), o antígeno “e” (HBeAg), o genoma viral e as enzimas DNA-polimerase e transcriptasereversa (KARAYIANNIS, 2003; DA SILVA, 2014).

O VHB apresenta um material genético compacto (Figura 1) sendo o único vírus de hepatite que contém uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) circular com fita dupla incompleta de cerca de 3,2 kilobases (Kb) de comprimento (HATZAKIS; MAGIORKINIS; HAIDA, 2006; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

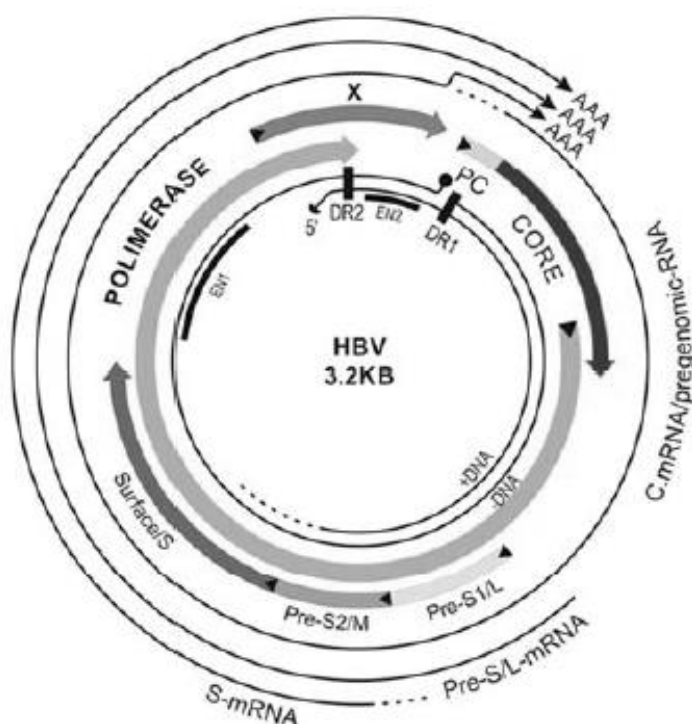


Figura 1: Organização Genômica do HBV

Fonte: SEEGER; MASON (2000)

O genoma do VHB está organizado em duas cadeias de polaridades invertidas, uma curta e incompleta de polaridade positiva, e outra longa e completa de polaridade negativa (BRUSS, 2004; BECK; NASAL, 2007), e apresenta também quatro regiões de leitura diferentes denominadas “*Open Reading Frames*”, ORF (SEEGER; MASON, 2000) designadas de: Pré-S1/Pré-S2/S com função de codificação das proteínas que formam o HBsAg e as proteínas *large*, *middle* e *small* (TIAN et al., 2007); Pré-C/C que sintetiza as proteínas do HBcAg e HBeAg (GANEM; PRINCE, 2004); P, responsável pela síntese da DNA-polimerase (LEE, 1997) e X, com a função de síntese da proteína X, que parece ter uma função fundamental na replicação viral e no surgimento do HCC (GROB, 1998; DA SILVA, 2014).

O VHB manifesta-se clinicamente na forma aguda, crônica e fulminante. Na forma aguda, o período de incubação varia de 1 a 6 meses, diversificando entre as formas assintomática ou sintomática (MCMAHON et al., 1985; MAHONEY, 1999; SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012).

A forma assintomática é frequentemente associada com doença leve ou subclínica com manifestações clínicas mais comumente encontradas em crianças com menos de 4 anos de idade, quando comparado a adultos com mais de 30 anos

de idade, o que acarreta na falta de diagnóstico na maioria dos casos (MCMAHON et al., 1985; WRIGHT; LAU, 1993; GANEM; PRINCE, 2004; SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

Em relação à forma sintomática, esta pode ocasionar náuseas, vômitos, mal-estar, anorexia, febre e sintomas semelhantes à gripe, podendo ser seguidos da presença de icterícia, fezes cor de barro ou pálidas, desconforto no quadrante superior direito e hepatomegalia (MAHONEY, 1999, SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012).

O aparecimento de sintomas durante a infecção aguda pelo VHB e as complicações causadas pelo vírus dependem da idade do indivíduo no momento da infecção. Os recém-nascidos e crianças são na maioria dos casos assintomáticos, enquanto que aproximadamente 70% dos adultos apresentam quadros de hepatite subclínica ou anictérica e 30% apresentam hepatite icterícia (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

A hepatite fulminante ocorre em menos de 1% dos indivíduos com infecção aguda pelo VHB, a taxa de mortalidade desses indivíduos é de cerca de 80% sem o transplante de fígado (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014). Essa manifestação clínica da hepatite B é definida “lesão hepática grave”, podendo ser reversível e com aparecimento de encefalopatia hepática dentro de 8 semanas após o aparecimento dos primeiros sintomas na ausência de doença hepática existente (BERNAL; WENDON, 2013).

A infecção crônica causada pelo VHB é caracterizada pela presença do antígeno HBsAg reagente no soro do paciente por um período superior a 6 meses (WRIGHT, 1980, MAHONEY, 1999; GANEM, PRINCE, 2004; SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012; TRÉPO CHAN; LOK, 2014). Esse estágio da infecção é reconhecido desde os anos 70 (WANDS et al., 1975; SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012), mas passou a ser extensivamente estudado a partir do final dos anos 90, quando estudos de referência foram publicados proporcionando uma nova visão sobre este vírus e seu potencial impacto clínico (CACCIOLA et al., 1999; SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012).

Em geral aproximadamente 5% de todas as infecções agudas pelo VHB evoluem para a forma crônica da doença. Até 90% das crianças que se infectam com o VHB através do contato materno fetal, se tornam portadores crônicos do VHB. Entretanto crianças que adquirem a infecção com VHB na faixa etária de 1 a 5 anos

de idade, geralmente 30-50% deste grupo se tornam portadores crônicos do vírus. Nos adultos, a infecção crônica somente é observada em 5% dos casos agudos da doença (TE; JENSEN, 2010; GOMES-GOUVÊA, 2014).

A infecção crônica pelo VHB pode ter várias consequências patológicas e clínicas importantes (SZMUNESS, 1978; ZUCKERMAN et al., 1983; MAYNARD, 1990; TORBENSON; THOMAS, 2002; SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012; BUENDIA; NEUVEUT, 2015). A forma crônica dessa infecção apresenta relevância clínica em pacientes imunocomprometidos (devido ao risco de reativação do VHB com consequente desenvolvimento de doenças hepáticas mais graves como a Cirrose Hepática e HCC), e em pacientes com fígado transplantado quando o doador é portador crônico do vírus da VHB (isso pode ocorrer quando o receptor não realiza a terapia normalmente) e nos procedimentos de transfusão sanguínea (presença do VHB oculto no doador) (TORBENSON; THOMAS, 2002; SAMAL, KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012).

1.3 Epidemiologia

Estima-se que cerca de 2 bilhões de pessoas já tiveram contato com o vírus da Hepatite B, sendo que deste número, aproximadamente 240 milhões de pessoas tornaram-se portadoras crônicas da doença (WHO, 2015).

A prevalência da Hepatite B varia de região para região no mundo e pode ser classificada como áreas de alta prevalência (> 8% da população), intermediária (entre 2 a 7% da população) ou de baixa prevalência (< 2% da população) (WHO, 2015). Cerca de 45% da população mundial infectada vive em regiões com alta prevalência como a China, sudoeste da Ásia, Continente Africano, Ilhas do Pacífico, parte do Canadá, Groelândia e na região da Bacia Amazônica (LEE, 1997; TE; JENSEN, 2010; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

No Brasil, onde a prevalência é considerada intermediária (entre 2 a 7% da população) (FATHIMOUGHADDAM et al., 2011), os estudos epidemiológicos da Hepatite B são escassos e no geral analisam grupos populacionais específicos (FOCACCIA et al., 2003).

Estudos a partir da década de 90 revelaram uma redução da endemicidade da infecção pelo VHB no Brasil (FOCACCIA et al., 1998; BRAGA et al., 2004; TAUIL et al., 2012) este fato, pode estar relacionado com a implantação das campanhas

universais de vacinação a partir de 1998 abrangendo todos os estados, além da adoção de medidas preventivas do Ministério da Saúde que a partir de 2001, determinou a realização de testes de triagem para Hepatite B e outras doenças nos centros de hemoterapia (BRASIL, 2003; TAUIL et al., 2012).

A prevenção é o fator considerado fundamental, haja vista que o VHB possui elevada capacidade de infectividade sendo capaz de causar diversas complicações como a Cirrose Hepática e o HCC (WHO, 2014). Somente em 2010, metade dos casos de mortalidade por câncer de fígado foram atribuídos a infecção pelo VHB, no período de 1990 a 2010, essa associação aumentou 62% com os casos de câncer de fígado e 29% com os casos de Cirrose Hepática (LOZANO et al., 2012; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014). Em razão destas características a infecção pelo VHB se torna um grave problema de saúde pública (WHO, 2015).

1.4 Transmissão

O vírus da hepatite B está presente em altas concentração no sangue e em outros fluidos orgânicos em menor proporção, como saliva, sêmen, secreção vaginal, urina, colostro ou leite materno e fezes. (TRIPATZIS, 1972; DARINI; GERBER, 1974; IRWIN et al, 1975; HOURANI et al., 1978; DAVISON; ALEXANDER; TROWBRIDGE, 1987; ZHANG et al., 1994; YANG ; LI ; SONG, 1999; MAST ; ALTER ; MARGOLIS, 1999; LAVANCHY, 2004; ZENG et al., 2006; WHO, 2015)

Estes vírus são altamente resistentes, sobrevivendo fora do corpo por até 7 dias (LOCARNINI, 2003; FONSECA, 2007) e infectando quem entrar em contato com os fluídos corporais infectados (MAST; ALTER; MARGOLIS, 1999; LAVANCHY, 2004; WHO, 2015), uma vez que sua infectividade é 10 vezes maior que a do Vírus da Hepatite C e cerca de 50 a 100 vezes maior que a do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KOMATSU et al., 2010; WHO, 2015).

A transmissão do VHB pode ocorrer através das relações sexuais, principalmente entre indivíduos não vacinados que mantém relações homossexuais ou heterossexuais com múltiplos parceiros, ou ainda através do contato com profissionais do sexo infectadas (WHO, 2015). Entretanto a transmissão pode ocorrer ainda por exposição percutânea (parenteral) a agulhas ou outros instrumentos contaminados, transfusão de sangue e hemoderivados, uso de drogas intravenosas, procedimentos odonto-médico-cirúrgicos quando não respeitadas às

regras de biossegurança, transmissão vertical (via transplacentária, no momento do parto, ou durante o aleitamento materno) e contatos domiciliares (FERREIRA; SILVEIRA, 2004, WHO, 2015).

A transfusão sanguínea era uma das formas mais comuns de transmissão do VHB, mas com as melhorias nos testes de diagnósticos e uma triagem mais eficaz nos últimos anos, como ocorreu nos países latinos americanos de 1994 a 1997, esse risco teve uma redução considerável (SCHMUNIS et al., 2001).

As formas de transmissão variam com a endemicidade, em áreas de alta endemicidade a forma mais comum de transmissão do vírus é vertical, na qual o vírus é transmitido no momento do parto, ou nos primeiros anos de vida do recém-nascido (BEASLEY, 1983; GUST, 1996; LOK, 2002; LAVANCHY, 2004; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014; WHO, 2015).

Nas áreas de endemicidade intermediária a forma de transmissão mais comum é a via horizontal (infecções por via sexual ou por inoculação percutânea através de objetos perfurocortantes) (GUST, 1996; LOK, 2002; LAVANCHY, 2004), por fim, nas áreas de baixa endemicidade, as infecções pelo VHB ocorrem geralmente por via horizontal no início da vida adulta por uso de drogas intravenosas ou por relações sexuais desprotegidas (GUST, 1996; LOK, 2002; LAVANCHY, 2004; TRÉPO, CHAN, LOK, 2014).

1.5 Diagnóstico

Os marcadores sorológicos para diagnóstico da Hepatite B (Figura 2), são constituídos dos antígenos HBsAg, HBeAg e dos anticorpos anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc Imunoglobulina M (anti-HBc IgM) e anti-HBc imunoglobulina G (anti-HBs IgG) (BRUNETTO et al., 1990; TRÉPO, CHAN; LOK, 2014). A presença de cada um dos anticorpos contra o VHB constitui interpretações clínicas diferentes, sendo o anti-HBe, quando presente nas fases iniciais da infecção, um indicativo de doença autolimitada associada com lesão hepática leve, normalização das atividades das enzimas Alanina Transaminase (AST) e Aspartato Transaminase (ALT) e diminuição da carga viral do VHB (BRUNETTO et al., 1990; SAMAL; KANDPAL; VIVEKNANDAN, 2012).

Em relação à presença do anti-HBcIgM, este surge entre a primeira e a segunda semana após o aparecimento do HBsAg sendo acompanhado pelo

aumento na concentração das enzimas AST e ALT e do aparecimento dos sintomas clínicos, indicando quadro de infecção aguda, enquanto o anticorpo anti-HBc IgG aparece na infecção crônica (LEE, 1997; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014). O anti-HBc IgM pode estar presente em pacientes com evoluções clínicas mais graves da infecção crônica com o VHB, porém a sua concentração no soro é menor que na infecção aguda (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

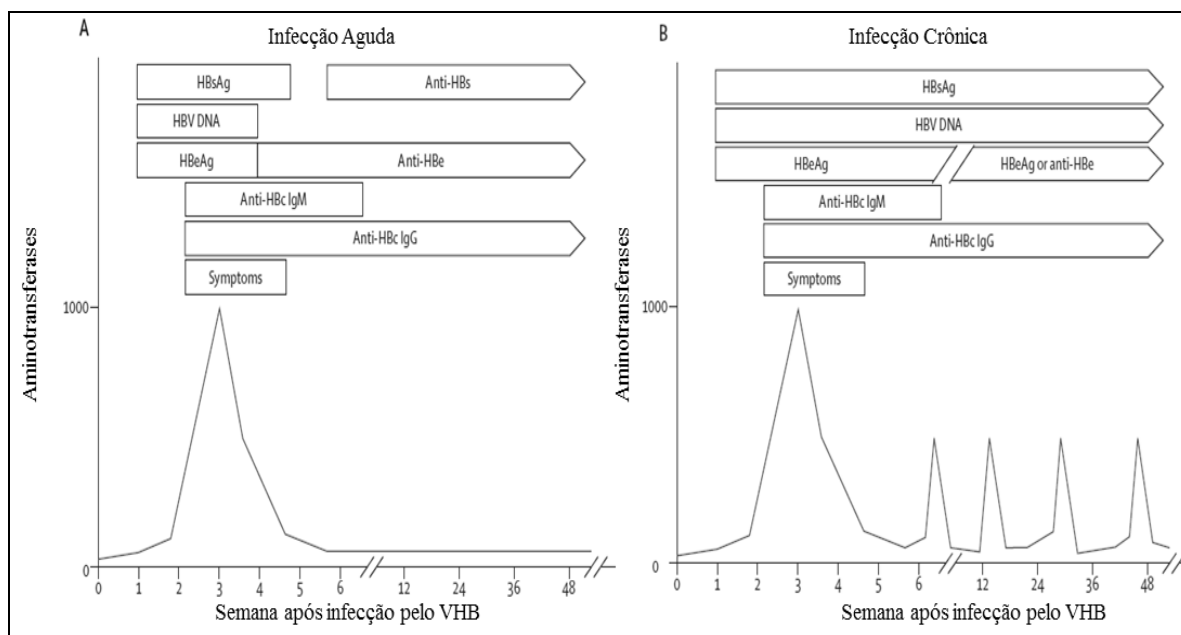


Figura 2: Marcadores sorológicos do VHB durante a evolução clínica na fase aguda (A) e na fase crônica (B).

Fonte: TRÉPO; CHAN; LOK (2014).

O aparecimento de anti-HBe, seguido pelo aparecimento de anti-HBs é característico de infecção aguda por VHB (MAHONEY, 1999; SAMAL; KANDPAL; VIVEKNANDAN, 2012). O anti-HBs permanece ativo durante vários anos, após a recuperação da infecção aguda pelo VHB, indicando a imunidade de proteção (SAMAL; KANDPAL; VIVEKNANDAN, 2012), desta forma este é o único marcador detectado em pessoas que adquiriram imunidade através da vacinação e normalmente se apresenta em associação com anti-HBc IgG naqueles indivíduos que se recuperaram de infecção anteriores por VHB (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

O antígeno HBsAg, quando presente por mais de 6 meses é indicativo de infecção crônica pelo VHB (HADZIYANNIS et al., 1983; SAMAL; KANDPAL; VIVEKNANDAN, 2012; TRÉPO; CHAN; LOK, 2014), este constitui um importante marcador na evolução clínica da hepatite B, pois aparece no soro do indivíduo entre

a 2ª e a 10ª semana após a infecção, antes mesmo do início dos sintomas clínicos e do aumento níveis plasmáticos de AST e ALT, desaparecendo entre o 4º e o 6º mês de infecção (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

Levando em consideração o antígeno HBeAg, este tem um importante significado clínico quando seus níveis são reduzidos em portadores crônicos, pois indicam uma fase tardia da infecção (GANEM; PRINCE, 2004). No passado, o HBeAg juntamente com o Anti-HBe era utilizado para demonstrar a replicação viral e a infecciosidade. Porém, essa utilização vem sendo amplamente substituída pela quantificação viral através do DNA do VHB (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

O diagnóstico molecular do VHB é particularmente útil na detecção da fase precoce da infecção aguda pelo vírus, antes mesmo do aparecimento do HBsAg no soro (HOURFAR et al., 2009). Os níveis de DNA do VHB constituem um dos marcadores mais úteis no controle na hepatite B crônica e quando associada a achados como, altos níveis plasmáticos de ALT, HBeAg reagente (+) e inflamação do fígado com ou sem fibrose, ajudam na avaliação e identificação dos pacientes com Hepatite B Viral Crônica que necessitam de tratamento (SAMAL; KANDPAL; VIVEKNANDAN, 2012).

A avaliação periódica dos níveis de DNA do VHB é realizada durante o tratamento antiviral para determinar o final do período terapêutico e identificar o surgimento de resistência aos medicamentos e falência do tratamento primário ou secundário (SAMAL; KANDPAL; VIVEKNANDAN, 2012). Métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos altamente sensíveis são comercialmente disponíveis para a estimativa de níveis de DNA do VHB (VIVEKANANDAN, 2010).

1.6 Prevenção

As estratégias de prevenção contra o vírus da Hepatite B são variadas e eficazes, incluem: comportamento sexual seguro; não reutilizar ou compartilhar agulhas e seringas; triagem obrigatória na doação de sangue; práticas de métodos eficazes na inativação viral dos hemoderivados e utilização adequada de procedimentos de biossegurança nos estabelecimentos de saúde e de embelezamento (MARIANO et al., 2004; HOU; LIU; GU, 2005; OLIVEIRA; FOCACCIA, 2010). Além dessas medidas preventivas, sabe-se que o risco de contrair o VHB também pode ser diminuído com a adoção de medidas preventivas

antes da exposição, como a imunização ativa contra a hepatite B (LAVANCHY, 2004).

A vacinação contra o VHB possui eficácia e segurança comprovadas desde 1982 com a disponibilização da primeira vacina derivada do plasma humano de indivíduos infectados (NIEDERAU, 2014). Posteriormente, foi desenvolvida a vacina recombinante composta pelo HBsAg recombinante purificado (JOSHI; KUMAR, 2001).

No ano de 1992 a Organização Mundial da Saúde estabeleceu como meta a inclusão da vacina contra Hepatite B nos programas universais de imunização infantil de todos os países até 1997 (CHANG, 2007). Desde então, mais de 1 bilhão de doses da vacina contra o VHB foram utilizadas no mundo (WHO, 2015).

No Brasil, a vacinação foi implantada de forma gradativa pelo Programa Nacional de Imunização, tendo início no ano 1989 em decorrência a uma alta prevalência na Amazônia Ocidental (BRASIL, 2013a). Em 1998, o governo brasileiro, ampliou a política de vacinação para todo o país, iniciando com menores de 1 ano e alterando gradativamente as faixas etárias abrangendo para os menores de 20 anos (2001), 20 a 24 anos (2011), 25 a 29 (2012) e de 30 a 49 anos (2013) (BRASIL, 2013b).

O objetivo da vacinação, além de prevenir a infecção aguda é prevenir a cronificação da doença e a sua evolução para a Cirrose Hepática e Carcinoma Hepatocelular (FERREIRA; SILVEIRA, 2004). A imunidade conferida pela vacina é muito eficaz, com taxas de proteção de 95%, com variações de 80 a 100% entre os indivíduos que são submetidos ao esquema completo. Uma série de três doses de vacina induz proteção com títulos de anti-HBs maiores que 10 UI/mL em 90% dos adultos e jovens saudáveis, e acima de 95% em lactantes, crianças e adolescentes (DAVIS, 2005; BRUGUERA, 2006).

1.7 Tratamento

A primeira droga a ser aprovada para o tratamento da VHB crônica foi o Interferon- α 2b (Intron®) em 1991, desde então outras drogas como a Lamivudina (Epivi-HBV®) (1998), AdenovirDipivoxil (Hepsera®) (2002), Interferon- α Peguilado (Pegasys®) e Entecavir (Baraclude®) (2005), Telbivudina (Tyzeca®) (2006) e

Tenofoviridisoproxilfumarato (Viread®) (2008) foram aprovadas para o uso na terapia (Figura 3) (BLOCK, RAWAT; BROSGART, 2015).

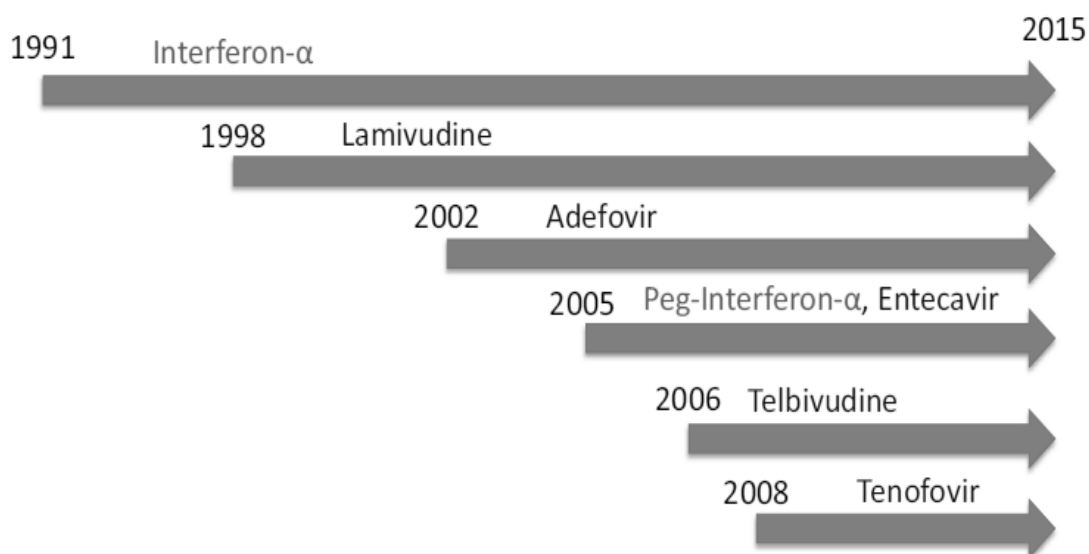


Figura 3: Histórico da utilização dos antirretrovirais
Fonte: BLOCK, RAWAT; BROSGART (2015)

Os agentes terapêuticos para o tratamento de pacientes portadores da forma crônica da infecção com VHB subdividem-se em duas classes: os agentes imunomoduladores (Interferon- α 2b e o peg-interferon- α); e os Análogos Nucleosídicos Orais (NA's) (Lamivudina, Adefovir, Telbivudina, Entecavir e Tenofovir) (BATIREL et al., 2014).

Os NA's apresentam como mecanismo de ação a inibição da ativação da HBV-DNA polimerase suprimindo a replicação viral (BATIREL et al., 2014). Dentre os medicamentos pertencentes aos NA's, o Entecavir e o Tenofovir Disoproxil Furamato são considerados de alta potência para uma consistente e durável supressão ao vírus e contra possíveis barreiras genéticas do vírus na resistência a essa classe de medicamentos, por essa razão, são considerados a primeira linha de defesa no tratamento contra o VHB (FUNG et al., 2011; BATIREL et al., 2014).

O tratamento da Hepatite B Crônica ocasiona a prevenção ou a redução no desenvolvimento de Cirrose Hepática e HCC, podendo ainda, suprimir a replicação viral, normalizar os níveis das aminotransferases, reduzir danos hepáticos e obter soro conversão de HBsAg (FERREIRA; SILVEIRA, 2004; NGUYEN; KEEFFE, 2009; WIENS et al., 2012).

1.8 Patogenia da Hepatite B

1.8.1 Infecção Aguda

A infecção aguda pelo vírus da hepatite B é caracterizada por desordem lobular no fígado, tumefação difusa (degeneração em forma de balão - nas quais as células apresentam o citoplasma vazio e com escassos grânulos eosinófilos das organelas citoplasmáticas), numerosos corpos apoptóticos, ativação de células Kupffer e linfócitos, além de inflamação no sistema portal hepático. Em caso de uma necrose lobular acentuada o quadro do paciente pode evoluir para hepatite fulminante (MANI; KLEINER, 2009).

Os indivíduos com quadro agudo geralmente não realizam biópsia do fígado, dessa forma, os padrões histopatológicos são observados geralmente em portadores crônicos, que apresentam ataques agudos de hepatite, pacientes com infecção concomitante ao vírus da hepatite D, ou pacientes com uma segunda possível causa de hepatite como, por exemplo, hepatite medicamentosa. Outra situação, com histopatologia semelhante à infecção aguda, ocorre em indivíduos crônicos com mutação pré-core (MANI; KLEINER, 2009). Os indivíduos com essa mutação não transcrevem o HBeAg, mesmo sendo portadores da forma crônica (WANG et al., 2016).

1.8.2 Infecção Crônica

Os aspectos patológicos na hepatite B crônica variam de lesões de grau leves, no qual a estrutura hepática é bem preservada com processo inflamatório limitado ao sistema porta hepático, a lesões mais severas, nas quais podem ser encontradas apoptose nos hepatócitos (BAUMERT, 2007).

Na classificação de severidade e progressão da hepatite crônica, são avaliados o grau de inflamação, destruição dos hepatócitos e o estágio da severidade da fibrose (BAUMERT, 2007). A perda contínua de hepatócitos e a deposição de tecidos fibrosos podem resultar em Cirrose Hepática, que é um processo caracterizado pela formação de nódulos grandes separados por cicatrizes variáveis e de tamanhos irregulares (LEIFELD, 2006).

A Cirrose Hepática é indicada como um grande passo para o desenvolvimento de Carcinoma Hepatocelular (HCC), 80% a 90% dos casos de HCC tem início com essa patologia (LLOVET; BURROUGHS; BRUIX, 2003).

1.8.3 Imunopatogenicidade

O VHB não altera a morfologia das células infectadas, os danos hepáticos quanto o controle viral é mediado pelo sistema imunológico (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014). A presença de células inflamatórias inespecíficas e as alterações necroinflamatórias que elas causam no infiltrado intra-hepático coincidem com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes na hepatite aguda e da lesão hepática apresentada pelos mesmos visualizados nas biopsias (REHERMANN; NASCIMBENI, 2005). Assim o resultado clínico da infecção se torna dependente de uma relação entre a replicação do VHB e a resposta imune do hospedeiro (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

O VHB atua discretamente no início da infecção, pois se trata de um vírus com baixa indução da resposta imune inata, mantendo-se sem ser detectado até o início da resposta imune adaptativa algumas semanas após a entrada do mesmo no organismo (WIELAND; CHISARI, 2005; CHISARI; ISOGAWA; WIELAND, 2010).

A resposta imune inata ocorre logo nas primeiras semanas de infecção sendo mediada pelas próprias células infectadas pelo VHB que produzem Interferon tipo I (INF-I) α/β após o reconhecimento do vírus (REHERMANN; NASCIMBENI, 2005). O INF-I α/β interfere na síntese viral através do bloqueio na ação de proteínas responsáveis pela replicação do vírus e atrai e ativa macrófagos (SAMUEL, 2001; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005).

Os macrófagos quando ativados secretam algumas citocinas como a Interleucina 12 (IL- 12) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF) que ativam as células *Natural Killer* (NK) para exercer sua atividade citotóxica contra as células infectadas pelo vírus (SAMUEL, 2001).

A resposta humoral mediada por anticorpos surge aproximadamente na décima semana após a infecção pelo VHB sendo muito importante na eliminação do VHB na fase aguda (BRUNETTO et al., 1990; VISO; BARONE, 2006). A resposta imune celular observada em indivíduos infectados com VHB é mediada pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ (REHERMANN, 2013), sendo essas células as principais

responsáveis pelo surgimento de lesões hepáticas na fase aguda e na fase crônica (ICHIKI et al., 2005).

A imunopatogenicidade é dividida em várias fases, estando entre elas a fase de imunotolerância caracterizada por alta replicação viral e baixa resposta inflamatória. Os achados clínicos nessa fase são caracterizados por alto níveis de HBV-DNA, HBsAg reagente (+), níveis das enzimas AST e ALT normais ou diminuídos em relação aos valores de referência, as alterações necroinflamatórias são leves ou não existentes, redução na produção de IL-10 e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF) (HUI et al., 2007; CHAN et al., 2010; GISH et al., 2015). Essa fase pode durar entre 20 a 40 anos com progressão mínima da doença e baixa taxa de soro conversão de HBeAg (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014).

A fase de *clearence* imunológico é caracterizada inicialmente por grandes oscilações nos níveis de HBV-DNA e das enzimas AST e ALT, variando de valores elevados para normais e de normais para diminuídos (CHAN et al., 2010; GISH et al., 2015). A variação das enzimas AST e ALT representam mudanças agudas na inflamação ou processos intermitentes de hepatites acarretando na perda do HBeAg e surgimento de anti-HBe na infecção (LOK et al., 1987; GISH et al., 2015). As condições necroinflamatórias nessa fase clínica variam de alta a mínima (GISH et al., 2015).

Pacientes com o HBeAg não reagente (-) são caracterizados com necroinflamação persistente (tentativas de *imunoclearence* ineficazes). Os níveis de HBV-DNA nesses pacientes variam de moderado para elevado e a doença hepática é progressiva (GISH et al., 2015).

A fase de portador inativo é caracterizada por níveis diminuídos ou indetectáveis de HBV-DNA, o HBeAg não reagente (-) e os níveis plasmáticos das enzimas AST e ALT se apresentam normalizados (GANEM; PRINCE, 2004). Embora os indivíduos infectados nessa fase já foram considerados “portadores saudáveis”, atualmente esse termo não é mais utilizado, visto que existe o risco do vírus se reativar no organismo do indivíduo infectado (CHU; LIAW, 2007).

A fase oculta da infecção crônica é caracterizada pela perda de HBsAg porém, existe a persistência da infecção intra-hepática na sua totalidade (GISH et al., 2015). Nessa fase não é possível detectar VHB-DNA no fígado, mas é possível detectar níveis muito baixos no soro, em alguns casos todos os marcadores

sorológicos são negativos (RAIMONDO et al., 2008; POLLICINO; RAIMONDO, 2014).

Aproximadamente 20 a 30% dos pacientes que sofrem soro conversão para HBeAg não reagente (-) podem apresentar reativação da infecção pelo VHB com aumentos de DNA viral e/ou das enzimas hepáticas AST e ALT (TRÉPO; CHAN; LOK, 2014). Esses pacientes que sofrem reativação apresentam um risco aumentado de desenvolver Cirrose Hepática e Carcinoma Hepatocelular (HCC) quando comparado aos que permanecem inativos (FATTOVICH et al., 2008).

1.9 Antígeno Leucocitário Humano - (HLA)

As moléculas de HLA são codificadas por genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex* - MHC) localizados em regiões diferentes no braço curto do cromossomo 6. A região de classe I é constituída pelos *loci*: HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L, enquanto a região de classe II inclui os *loci*: HLA-DRA; DRB1-9; DQA1,2; DQB1,3; DOA; DOB; DMA; DMB; DPA1,2; DPB1,2; TAP1,2; LMP2,7; MICA-E. A região de classe III é composta por genes envolvidos na síntese de componentes do sistema complemento (DONADI, 2000).

Os genes HLA-A, B e C, pertencentes a região de classe I, codificam moléculas de histocompatibilidade presentes em praticamente todas as células nucleadas, porém os genes HLA-E, F e G codificam moléculas restritas a alguns tipos teciduais. Os demais *loci*, HLA-H, J, K e L, são consideradas pseudogenes já que não codificarem proteínas (DONADI, 2000).

Os genes HLA-DR, DQ e DP, de classe II, possuem como produto moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe II, estando relacionadas com a rejeição contra enxertos e na apresentação de peptídeos aos receptores dos linfócitos T. Os genes DOA e DOB de classe II, por sua vez, codificam as cadeias α e β , respectivamente, originando moléculas com estrutura semelhante as codificadas pelos genes clássicos de classe II. Os genes DRB2, 6, 7, 8 e 9; DQA2, DQB2 e DQB3, e o DPA2 e DPB2 são considerados pseudogenes, ou seja, não codificam proteínas (DONADI, 2000).

Além desses, existem também genes envolvidos do processamento, transporte e associação de peptídeo às moléculas do MHC. Os genes LMP 2 e 7,

por exemplo, estão relacionados com a codificação de proteassomas que atuam como endopeptidases, acarretando em degradação de proteínas citosólicas endógenas ou virais em pequenos peptídeos. Outro exemplo, é o transporte de peptídeos degradados no citosol para o retículo endoplasmático pelos produtos dos genes TAP 1 e 2, facilitando a associação do peptídeo com a molécula MHC de classe I (DONADI, 2000).

Por fim, dentro dos genes de classe II, encontram-se as moléculas HLA-DMA e DMB que auxiliam no processamento e inserção do peptídeo às moléculas clássicas de histocompatibilidade de classe II (DONADI, 2000).

Além das regiões de classe I e II, há também uma região de classe III composta por genes que codificam componentes como C4A, C4B e o fator B do sistema do complemento, e enzimas 21-hidroxilase (21B, 21A), proteína do choque térmico (Hsp 70) e os fatores de necrose tumoral TNF- α e β (DONADI, 2000).

O esquema da região do MHC está demonstrado na imagem adaptada de DONADI, 2000 (Figura 4).

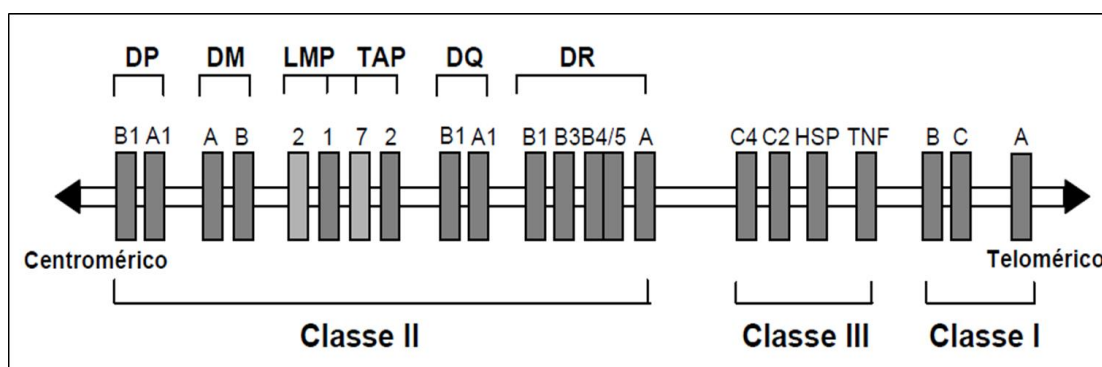


Figura 4: Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), humano, no braço curto do cromossomo 6.

Fonte: DONADI (2000).

1.9.1 Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G)

O gene HLA-G foi descrito por Geraghty e colaboradores (1987), estando esse gene localizado especificamente no braço curto do cromossomo 6 na posição 6p21.2-21.3 entre os genes HLA-F e HLA-A (KOLLER et al., 1989; DIAS et al., 2015; AMIOT; VU; SAMSON, 2015) fazendo parte do MHC (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987; AMIOT; VU; SAMSON, 2015), pois possui cerca sete íntrons e oito

éxons, se assemelhando a outros genes de HLA de classe I (DONADI et al., 2011; AMIOT; VU; SAMSON, 2015).

Apesar da semelhança, o HLA-G é denominado como HLA não-clássico, pois apresenta diferenças na diversidade genética, estrutura, expressão e função quando comparado com os genes HLA clássicos (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987; AMIOT; VU; SAMSON, 2015).

Segundo resultados atuais do banco de dados do Projeto Internacional de Imunogenética (do inglês *International Immunogenetics Project* – IMGT) o gene HLA-G apresenta apenas 53 alelos, o que limita seu polimorfismo frente aos HLA clássicos que são muito mais polimórficos. Além disso, se difere quanto a estrutura apresentando uma região 3' não traduzida (3'UTR) contendo vários elementos reguladores, incluindo ricos *motifs* (receptores) AU (aminoácidos Adenina-Uracila) e um sinal denominado cauda poli-A, que influenciam na estabilidade do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), no volume, na mobilidade e nos padrões de *splicing* (DONADI et al., 2011).

Outra diferença está na função, uma vez que o HLA-G aparentemente não inicia respostas imunes como os HLAs de classe I, estando associado com a indução de estímulos inibitórios a células do sistema imune devido a interações diretas com múltiplos receptores inibitórios, incluindo: ILT2/CD85j/LILRB1 (ILT2), ILT4/CD85d/LILRB2 (ILT4) e KIR2DL4/CD158d (KIR2DL4) (CAROSELLA et al., 2008; BRENOL et al., 2012; CATAMO et al., 2014; DIAS et al., 2015).

O gene HLA-G transcreve proteínas transmembranas através de *splicing* alternativo (Figura 5) de transcritos primários originando sete formas codificadas diferentes, estando entre elas as isoformas ligadas às membranas (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e as solúveis (HLA-G5, -G6, G7) (ISHITANI; GERAGHTY, 1992; CAROSELLA et al., 2008; AMIOT; VU; SAMSON, 2015). As proteínas do gene HLA-G são consideradas heterodímeros, pois possuem uma cadeia pesada composta por três domínios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), uma região transmembrana e um domínio citoplasmático curto, associada a uma cadeia leve ($\alpha 2$ -microglobulina) (ISHITANI; GERAGHTY, 1992; DONADI et al., 2011; AMIOT et al., 2012; AMIOT; VU; SAMSON, 2015). Essa estrutura confere capacidade do HLA-G formar dímeros a partir do estabelecimento de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína individuais nas posições 42 (Cys42-Cys42) e 147 (Cys42-Cys147) da cadeia pesada de HLA-G (BOYSON et al., 2002; AMIOT; VU; SAMSON, 2015). Os dímeros, por sua vez,

fornece uma maior afinidade a receptores ocasionando uma dissociação mais lenta do que os monómeros (SHIROISHI et al., 2006; AMIOT; VU; SAMSON, 2015).

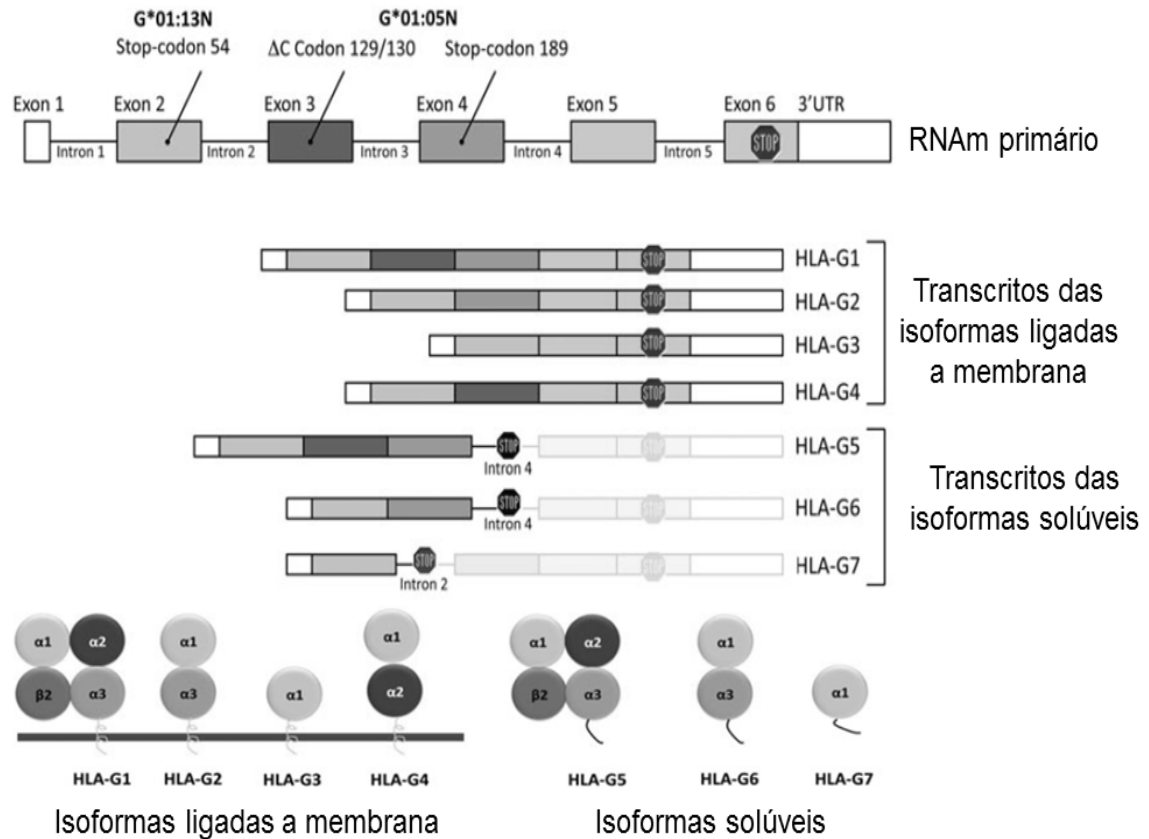


Figura 5: Isoformas do HLA-G produzidas por Splicing alternativo do RNAm primário.
Fonte: DONADI et al., (2011).

As isoformas do gene HLA-G podem ser expressas em condições fisiológicas pelos tecidos fetais (células amnióticas, precursores eritróides e citotrofoblastos), sítios imunológicos privilegiados que incluem córnea, timo, ilhotas pancreáticas, precursores de células endoteliais e eritroblastos (KOVATS et al., 1989; HVIID, 2006; CAROSELLA et al., 2008), células dendríticas (DC), macrófagos (AMIOT et al., 2012) e células *Natural Killer* (NK) (OSTAPCHUK et al., 2015). A expressão das isoformas podem ser induzidas em situações clínicas como transplantes (BRUGIÈRE et al., 2009; KANEKU, 2006), tumores (AMIOT et al., 2012), doenças autoimunes (WASTOWSKI et al., 2009; VEIT, et al., 2009), doenças inflamatórias (GERASIMOU et al., 2016), infecções bacterianas (BORTOLOTTI et al., 2015; OLIVEIRA-SOUZA et al., 2016; GENRE et al., 2016; RIZZO et al., 2016), infecções parasitárias por protozoários (COURTIN et al., 2013; SADISSOU et al., 2014; DIAS

et al., 2015) e infecções virais (AMIOT et al., 2012) como o caso da infecção pelo Vírus da Hepatite (LAARIBI et al., 2015).

Nos transplantes, devido aos diversos mecanismos de rejeição relacionados aos órgãos transplantados, muitos esforços têm sido dedicados à compreensão dos mecanismos associados a rejeição ou a aceitação do órgão. A influência das isoformas expressas nos casos de transplantes passou a ser amplamente estudada após a descoberta, no início dos anos 90, do desempenho fisiológico do HLA-G na tolerância materno fetal (DONADI et al., 2011). Diversos estudos têm relatado a presença do HLA-G no processo de rejeição (BRUGIÈRE et al., 2009) e o aumento das formas solúveis (KANEKU, 2006) associados com um melhor prognóstico do transplante ou com aumento da sobrevida do órgão transplantado (DONADI et al., 2011).

Nas doenças autoimunes, como a esclerose múltipla, algumas isoformas solúveis de HLA-G ou isoformas de membrana, expressas por células do tecido lesado, podem diminuir as manifestações autoimunes da doença (WASTOWSKI et al., 2009; DONADI et al., 2011). Considerando que o HLA-G exerce efeito tolerogênico de longo prazo por meio da geração de células imunes supressoras (VEIT et al., 2009; DONADI et al., 2011), e que a autoimunidade é causada por uma ruptura da tolerância, pode-se supor que a expressão de HLA-G seja fundamental neste perfil de doenças (DONADI et al., 2011).

O HLA-G também tem um suposto papel nas alterações da imunogenicidade dos tumores através da diminuição da eliminação de células tumorais. Essa influência ocorre devido à inibição da função das células T citotóxica e NK, através de um mecanismo denominado trogocitose (LEMAOULT et al., 2007). Consequentemente a essa influência, o HLA-G está correlacionado com malignidade de carcinomas de ovário e de mama (MENIER et al., 2009), lesões melanocíticas (REBMANN; WAGNER; GROSSE-WILDE, 2007) e tumores gástricos (ISHIGAMI et al., 2006).

Nas doenças hematopoiéticas malignas, estudos demonstraram a expressão de HLA-G evidenciada particularmente na leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica de linfócitos B (LLC-B) (CAROSELLA et al., 2008).

Nas infecções bacterianas o papel do HLA-G ainda não foi bem definido, sabe-se até o momento que ocorreu um aumento da expressão do HLA-G em

pacientes com infecções por *Helicobacter pylori* (OLIVEIRA-SOUZA et al., 2016; GENRE et al., 2016) e *Pseudomonas aeruginosas* (BORTOLOTTI et al., 2015; RIZZO et al., 2016).

1.9.2 HLA-G e doenças virais

Os vírus desenvolvem diversas formas de defesa frente ao sistema imune do hospedeiro sendo capazes de inibir a expressão do antígeno pelo MHC de classe I na superfície da célula, dificultando consequentemente a citólise de linfócitos T (HANSEN; BOUVIER, 2009; CATAMO et al., 2014). A regulação do MHC de classe I expõe as células infectadas a ação citotóxica realizada pelas células NK (ONNO et al., 2000; LOZANO et al., 2002; CATAMO et al., 2014), porém para se proteger da ação dessa e de outras células do sistema imunológico (LE GAL et al., 1999; HANSEN; BOUVIER, 2009; CATAMO et al., 2014), os vírus, assim como os tumores, têm desenvolvido mecanismos para impedir o reconhecimento das células NK através da indução da expressão de moléculas de HLA-G (ONNO et al., 2000).

Esse mecanismo pode suprimir a função de várias células do sistema imune (PARK et al., 2004), como por exemplo, a inibição da citotoxicidade dos Linfócitos T CD8+, maturação de células dendríticas e indução de secreção de citocinas favorecendo um perfil de resposta imune desempenhadas por linfócitos T do subtipo T *helper*-2 (Th-2) (LESPORT et al., 2009; CAROSELLA et al., 2008; LAARIBI et al., 2015).

Essas propriedades imunossupressoras do HLA-G podem contribuir para a sensibilidade e a persistência de infecções virais (DONADI et al., 2011) podendo ser relatada em diversas situações (CATAMO et al., 2014) como observado em estudo de Lozano e colaboradores (2002) ao analisar monócitos obtidos de pacientes franceses portadores do vírus da imunodeficiência adquirida-1 (HIV-1) observaram que a maioria das células desses pacientes expressavam o HLA-G. Esse estudo observou ainda que do total de linfócitos observados, cerca de 30% apresentou expressão de HLA-G enquanto apenas 1% dos linfócitos dos indivíduos saudáveis expressaram esta molécula.

O aumento da expressão de HLA-G como forma de proteção contra a ação citotóxica das células NK também foi observada em casos de infecção por vírus neurotrópicos, como o vírus da raiva e o vírus do herpes simplex (WIENDL, 2007).

As principais estruturas encontradas foram as isoformas 1 (HLA-G1) ligada a membrana de neurônios infectados e as isoformas 5 (HLA-G5) solúveis no plasma (LAFON et al., 2005).

A expressão de HLA-G também foi investigada na Hepatite C, onde Amiot e colaboradores (2014) avaliaram a expressão das isoformas de membrana e solúvel de HLA-G em mastócitos de pacientes franceses portadores do vírus da Hepatite C e observaram que a expressão de HLA-G estava relacionada com o aparecimento de fibrose nesta patologia.

1.9.3 HLA-G e Hepatite B

Em estudo abrangendo indivíduos chineses portadores de Hepatite B, realizado por Shi e colaboradores (2011) demonstrou resultados significativos quanto ao aumento dos níveis séricos das formas solúveis de HLA-G em pacientes portadores da forma crônica da doença, além de um aumento na expressão de HLA-G na superfície de monócitos e um elevado número de células T reguladoras no sangue periférico. Os resultados obtidos nesse estudo apontam uma influência da indução da expressão de HLA-G no desenvolvimento de um desvio de resposta imune nesse tipo de infecção e verificaram que as formas solúveis de HLA-G podem constituir um importante marcador bioquímico (SHI et al., 2011).

Em relação a estudos com pacientes chineses portadores de Hepatite B, Han e colaboradores (2014) avaliaram a expressão das isoformas de membrana e solúvel de HLA-G na Hepatite B em pacientes chineses, relacionando a expressão desta molécula com a patogênese da Hepatite B, sobretudo no desenvolvimento da forma crônica da doença.

A expressão das isoformas de HLA-G ligadas a membrana de hepatócitos foi analisada em pacientes brasileiros portadores da forma crônica de Hepatite B. Esse estudo mostrou que a molécula de HLA-G ligada a membrana estava presente em todos os estágios dessa infecção e ainda encontraram relação do aumento da expressão com fases mais avançadas, o que demonstra de certa forma relação com a cronificação da doença (SOUTO et al., 2011).

1.9.4 Regulação da expressão gênica do HLA-G

Os mecanismos de regulação da expressão da molécula de HLA-G continuam desconhecidos, sabe-se que o mecanismo difere das moléculas clássicas de HLA. A presença de uma região promotora do gene HLA-G com muitos elementos típicos suprimidos ou modificados, tornando a expressão do HLA-G irresponsiva a fatores estimuladores de HLA clássicos é uma das principais diferenças no padrão de expressão das estruturas (GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000).

Outro fator que difere essa expressão está na localização das regiões promotoras, os genes HLA clássicos apresentam a região promotora dentro de 220 pares de base a montante do códon de iniciação Adenina-Timina-Guanina (ATG). Em todo caso, os elementos reguladores do gene HLA-G estão localizados em uma região que abrange aproximadamente 1,5 quilo bases (Kb) a montante do códon de iniciação (SOLIER et al., 2001). Vários fatores podem influenciar essa expressão do gene, estando entre elas a presença de citocinas como: IL-10 (MOREAU et al., 1999), INFs (LEFEBVRE et al., 2001), Fator estimulador de colônia de Macrófagos e Granulócitos (GM-CS) (AMIOT et al., 1998), glicocorticóides (MOREAU et al., 2001) e hormônios como a progesterona (YIE; XIAO; LIBRACH, 2006).

1.9.4.1 Fatores envolvidos na expressão hepática do HLA-G

A expressão de HLA-G depende de fatores presentes no microambiente hepático, como as citocinas (AMIOT; VU; SAMSON, 2015). E sabe-se que diversas citocinas, incluindo o Interferons (IFNs), IL-10, GM-CSF (Fator estimulante de colônias de granulócitos- macrófago), IL-2, e Fator de Crescimento Tumoral (TGF- β) aumentam a expressão de HLA-G em modelos *in vitro* (MOREAU et al., 1999; YANG; GERAGHTY; HUNT, 1995; AMIOT; VU; SAMSON, 2015). Outros fatores locais envolvidos no aumento da expressão de HLA-G, além das citocinas, são a hipóxia e a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (GONZALEZ-HERNANDEZ, 2005; AMIOT; VU; SAMSON, 2015).

O perfil de expressão dos fatores do microambiente difere entre as doenças, mas podem ser considerados como uma forma de explicação para os padrões de expressão de HLA-G em patologias hepáticas como câncer do fígado, hepatite e transplante. Além disso, os mecanismos epigenéticos, tais como a metilação do DNA

e a desacetilação da histona, têm sido observados em câncer e em alguns tratamentos antitumorais, e são conhecidos na regulação da expressão de HLA-G (AMIOT et al., 2014). Nas infecções virais, as proteínas virais interferem no fluxo intracelular de HLA-G, proporcionando um mecanismo adicional para a modulação da expressão de HLA-G (AMIOT; VU; SAMSON, 2015).

A expressão de isoformas de HLA-G ligadas a membrana foi observada em células hepáticas fetais e adultas, mas os níveis de transcrição foram maiores em tecidos fetais. As células mesenquimais presentes no fígado dos fetos contêm depósitos intracelulares de HLA-G (ONNO et al., 1994; AMIOT; VU; SAMSON, 2015).

A expressão de HLA-G tem sido observada em hepatócitos, monócitos e células tumorais, porém ainda há debates acerca da eventual expressão nos hepatócitos. Em algumas condições específicas, a expressão do HLA-G pode ser detectada em linfócitos T e em células como monócitos e células dendríticas. As células alvo das moléculas de HLA-G são periféricas e expressam receptores que reconhecem essas moléculas, dentre estas células estão incluídas: linfócitos T e B, células NK, monócito, células endoteliais e mastócitos (Figura 6) (AMIOT; VU; SAMSON, 2015).

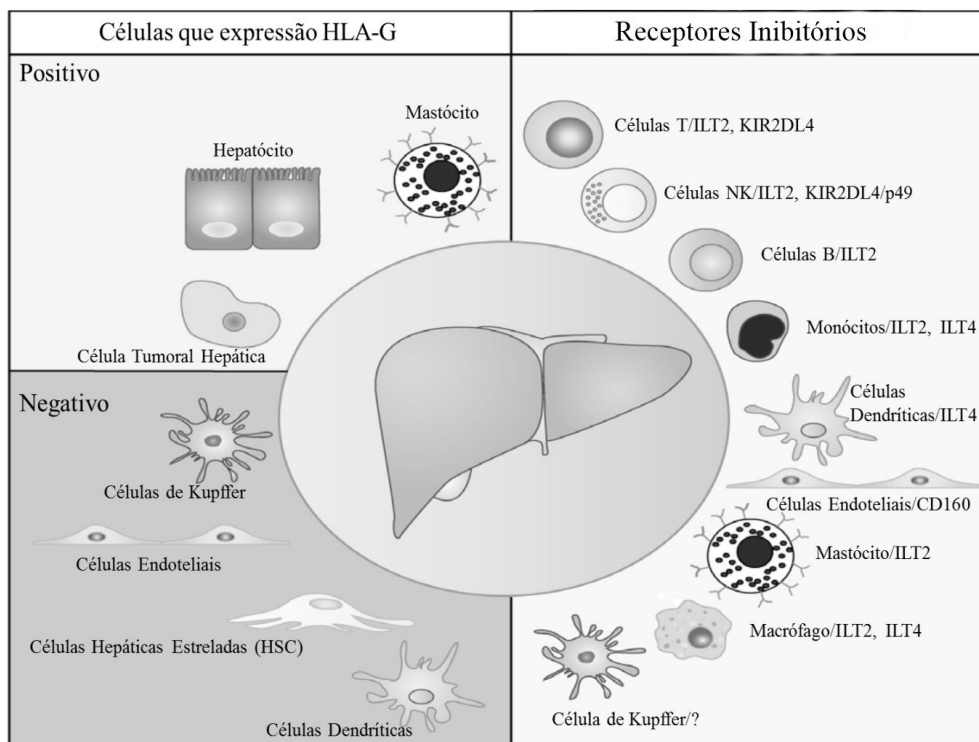


Figura 6: Células que expressão HLA-G e células com receptores de HLA-G
Fonte: Adaptado de AMIOT; VU; SAMSON, (2015).

1.9.4.2 HLA-G e estudos de polimorfismos gênicos na região 3' UTR

O gene HLA-G possui uma baixa variabilidade genética e aparentemente a expressão do HLA-G em condições normais ou patológicas podem depender das regiões reguladoras do gene, ou seja, 5' URR e 3' UTR, e fatores do microambiente (DONADI et al., 2011). Ambas as regiões reguladoras do gene HLA-G possuem um elevado grau de variabilidade genética e podem influenciar a expressão do HLA-G. Existem ao menos 29 sítios polimórficos descritos na região promotora que podem ser alvo de fatores de transcrição (ALBUQUERQUE et al., 2016).

A região 3' UTR contém vários elementos reguladores pós-transcricional estando entre eles os sítios polimórficos + 3142 C/G, + 3001 C/T, + 3187 A/G, + 3196 C/T, + 3003 C/T, + 3010C/G, + 3027 A/C, 3035 C/T e Inserção/Deleção de 14 pares de base (pb) (ALBUQUERQUE et al., 2016) que podem influenciar na expressão das moléculas de HLA-G (DONADI et al., 2011).

Estudos recentes tem correlacionado o polimorfismo de Deleção (Del)/Inserção (Ins) do gene HLA-G, também conhecido como (DEL/INS) de 14 pb na região 3' não traduzida (3' UTR), com diferentes patologias como câncer (HAGHI et al., 2015), pré-eclampsia (PABALAN et al., 2015), abortos recorrentes (AL OMAR et al., 2015), diabetes mellitus tipo 1 (ALBUQUERQUE et al., 2016; GERASIMOU et al., 2016), vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HONG et al., 2015), infecções bacterianas por *helicobacter pylori* (GENRE et al., 2016), tripanossomíase humana africana (COURTIN et al., 2013) e Hepatite B (LAARIBI et al., 2015).

Os genótipos provindos do polimorfismo Del/Ins de 14pb divergem em sua interpretação, estando o genótipo Ins/Ins associado com níveis reduzidos de RNAm e isoformas proteicas (HIBY et al., 1999; HVIID et al., 2003; TAN et al., 2007; RIZZO et al., 2012). Os genótipos Del/Del e Del/Ins são responsáveis por uma maior produção de moléculas HLA-G solúveis (HLA-G5 a HLA-G7) (RIZZO et al., 2012; LAARIBI et al., 2015), que podem estar associadas com inibição da ação citotóxica das células NK e dos Linfócitos T citotóxicos (LE GAL et al., 1999; HAN et al., 2014), além de suprimir as funções dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (BAHRI et al., 2006; HAN et al., 2014).

O polimorfismo de Del/Ins de 14-pb na região 3' UTR em pacientes portadores de VHB foi correlacionado com a cronificação da Hepatite B, devido a mutação estar relacionada ao favorecimento do escape viral frente a resposta

imunológica do indivíduo infectado pelo VHB (LAARIBI et al., 2015) e com o surgimento de complicações clínicas como o HCC (ZHANG et al., 2012; JIANG et al., 2011).

Outros polimorfismos, denominados *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), também podem ser encontrados na região 3' UTR, influenciando o gene HLA-G. Entre esses destacam-se os polimorfismos + 3142 C/G, + 3187 A/G, + 3196 C/T, + 3001 C/T, + 3003 C/T, + 3010C/G, + 3027 A/C e 3035 C/T (CASTELLI et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2016).

O polimorfismo + 3142 C/G, por exemplo, está associado com a variação da produção do RNAm, quando há inserção da base nitrogenada Guanina ocorre uma diminuição da afinidade da região 3' UTR por microRNAs (miR-148a, miR-148b e miR-152) levando a uma redução da disponibilidade de RNAm (CASTELLI et al., 2009; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013).

Estudos recentes observaram que no polimorfismo + 3142 C/G, os genótipos de heterozigose C/G e homozigose C/C estão relacionados com maior produção de HLA-G solúvel, levando a um maior risco de desenvolver doença coronariana (ZIDI et al., 2016a) e maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama (ZIDI et al., 2016b). Entretanto o genótipo de homozigose +3142 G/G, está relacionado a baixa produção de HLA-G solúvel, conduzindo dessa forma a um aumento no risco de desenvolvimento de doenças autoimunes como Artrite Reumatoide (VEIT et al., 2014) e Lúpus Eritematoso Sistêmico (CONSIGLIO et al., 2011).

1.9.5 Aplicabilidade clínica do conhecimento sobre HLA-G

O HLA-G possui característica imunomodulatória, constatado inicialmente na interface materno-fetal e posteriormente descrito em algumas condições patológicas como doenças autoimunes, tumores, infecções bacterianas, parasitárias e virais. O papel do HLA-G nessas condições patológicas pode ser maléfico ou benéfico, nos pacientes acometidos com infecções virais e câncer, por exemplo, o aumento da expressão de HLA-G demonstrou-se prejudicial, uma vez que desenvolve papel inibitório (DONADI et al., 2011).

O conhecimento do comportamento dos níveis de expressão de HLA-G e suas influências podem ser aplicadas no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e terapêuticas (BRENOL et al., 2012). Estudos demonstram que a

utilização da quantificação de HLA-G pode ser aplicada como marcador de qualidade dos embriões nos tratamentos para reprodução assistida (GONZÁLEZ et al., 2012).

Outros estudos demonstraram que a quantificação do HLA-G solúvel ou expresso em membrana do enxerto transplantado auxiliam na terapêutica deste procedimento, pois pode indicar o maior risco de rejeição, uma vez que a redução dos níveis de HLA-G expressos foi associada ao maior risco de rejeição do enxerto (DESCHASEAUX et al., 2011).

A relevância da expressão de HLA-G em tumores foi vastamente investigada, e os resultados apontam que essas estruturas foram expressas em uma maior quantidade em tecidos tumorais, e raramente nos tecidos não tumorais adjacentes. Tais achados clínicos demonstraram que as moléculas de HLA-G podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento tumoral, representando um potencial clínico, sendo utilizados como marcador tumoral no diagnóstico e prognóstico de diversos tipos de cânceres (YAN, 2011).

Além da importância no diagnóstico de tumores, o HLA-G pode ser também visto como uma proposta de terapia baseando-se na inibição da expressão, impedindo que as células tumorais escapem da atuação do sistema imunológico. Algumas linhas de pensamento acreditam que a associação de imunoterapia, com a utilização de anticorpos neutralizantes dos efeitos inibitórios do HLA-G, associado as drogas anticancerígenas, poderia maximizar os efeitos terapêuticos dessas drogas e diminuir seus efeitos colaterais (YAN, 2011).

O HLA-G nas infecções virais, como na hepatite B, desenvolvem mecanismos para impedir o reconhecimento das células NK, assim como nos tumores (ONNO et al., 2000). Estudos demonstram que o aumento da expressão dessa molécula favorece o escape viral e a cronificação da Hepatite B (HAN et al., 2014).

Dessa maneira, tendo em vista as complicações clínicas acarretadas pelo aumento da expressão de HLA-G na infecção pelo VHB e considerando o reduzido número de estudos voltados para essa relação. Estudos voltados a avaliação da relação dos polimorfismos da região 3' não traduzida com as complicações clínicas (Cirrose Hepática e o Hepatocarcinoma Celular) decorrentes da infecção pelo VHB devem ser realizados.

A hepatite B consiste num perfil de doença infecciosa, causada por vírus, que pode variar entre doença assintomática ou sintomática. Este tipo de vírus

desenvolveu diferentes estratégias de replicação, ciclos de vida, e formas altamente eficientes que resultam no desenvolvimento da forma crônica da doença. Acredita-se que no mundo mais de 240 milhões de pessoas infectadas apresentam a infecção na forma crônica. Além disso, muitas pessoas podem estar contaminadas com o vírus da hepatite B e ainda não foram diagnosticadas e tratadas pelo fato de estarem apresentando a forma assintomática da infecção. Novas técnicas para auxiliar o diagnóstico, como a determinação do polimorfismo de Ins/Del de 14-pb e dos SNPs na região 3' não traduzida do gene do HLA-G, podem auxiliar nos casos de hepatite B oculta, já que os níveis de HLA-G nessa fase são aumentados. Mas até o presente momento o papel do HLA-G ainda não foi bem esclarecido, dentro dos mecanismos patogênicos da infecção pelo VHB. Dessa forma, estudos nesta linha de pesquisa tornam-se necessários.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a incidência e o perfil epidemiológico de casos de Hepatite B no norte do estado do Espírito Santo, assim como, a influência dos polimorfismos da região 3' UTR do gene *HLA-G* localizados dentro do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e relacionar os mesmos com as formas clínicas da Hepatite B.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o levantamento do número dos casos notificados de Hepatite B, junto à superintendência regional de saúde local no município de São Mateus e das cidades vizinhas que fazem parte da região norte do Espírito Santo;
- Analisar prontuários dos pacientes para obtenção das características clínicas e laboratoriais, além dos medicamentos que estão sendo utilizadas no tratamento;
- Avaliar os polimorfismos Ins/Del de 14 pares de base e os *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) (+3003 C/T, +3010C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 C/G, +3187 A/G e +3196 G/C,) na região 3' UTR do gene *HLA-G* situado dentro do MHC em pacientes provenientes do norte do estado do Espírito Santo e da região centro-oeste no estado do Mato Grosso;
- Associar os polimorfismos de genes situados dentro do MHC (*HLA-G*) com os achados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, assim como risco de desenvolvimento de Hepatite B.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo com o parecer nº 439.272/2013 para os estudos de georeferenciamento e nº 974.840/2015 para o estudo de polimorfismos gênicos. Em relação a inclusão das amostras de pacientes do Mato Grosso no estudo, o mesmo foi aprovado conforme parecer nº 534/CEP-HUJM/08 CEP do Hospital Universitário Júlio Muller da Universidade Federal do Mato Grosso.

4.2 Caracterização da amostra

O levantamento de dados para o número de notificações de casos de Hepatite B, estudo de georeferenciamento e análise de prontuários médicos contou com pacientes de 11 municípios da região norte do Espírito Santo (Boa Esperança, Conceição da Barra, Ecoporanga, Jaguaré, Montanha, Mucurici, Nova Venécia, Pedro Canário, Pinheiros, Ponto Belo e São Mateus).

Segundo os dados obtidos na Superintendência Regional de Saúde de São Mateus-ES em 2012, conforme último CENSO realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), as populações dos onze municípios da região norte do Espírito Santo (Boa Esperança, Conceição da Barra, Ecoporanga, Jaguaré, Montanha, Mucurici, Nova Venécia, Pedro Canário, Pinheiros, Ponto Belo e São Mateus) foram respectivamente, 14.239 habitantes (hab.), 28.599 hab., 23.153 hab., 25.072 hab., 17.899 hab., 5.636 hab., 46.262 hab., 23.935 hab., 24.093 hab., 7.034 hab. e 110.453 hab.

As informações sobre estes indivíduos foram obtidas na Superintendência Regional de Saúde do município que disponibilizou o acesso à base de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e aos prontuários dos pacientes atendidos pelo Centro Regional de Especialidades – São Mateus (CRE-SM).

A análise dos prontuários dos pacientes ocorreu por busca ativa dos dados clínicos relevantes para a pesquisa, estando entre eles:

- Município de residência;
- Idade;
- Sexo;
- Cor;
- Carga viral (VHB-DNA);
- Terapia Medicamentosa;
- Evolução Clínica.

Após a obtenção dos dados, os mesmos foram compilados no programa *Microsoft® Excel®* 2013, no qual, estratificou-se pelo perfil dos pacientes (Idade, Sexo e Cor), município de residência, carga viral (Valores de Referência: < 2000 UI/mL, > 2000 UI/ml e Não Realizado (NR)), terapia medicamentosa e evolução clínica (Cirrose Hepática e Hepatocarcinoma Celular - HCC).

No estudo do polimorfismo na região 3' não traduzida do gene HLA-G foram avaliados 195 pacientes diagnosticados com Hepatite B, portadores da forma crônica, em tratamento ou recém diagnosticados. Os pacientes avaliados foram atendidos no Centro Regional de Especialidades da Superintendência Regional de Saúde de São Mateus (40 pacientes) e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso (155 pacientes).

O grupo controle para os estudos de polimorfismos genéticos foi formado por 195 indivíduos sadios, doadores voluntários de sangue e medula óssea de ambos os sexos e faixas etárias pareadas quando possível aos pacientes em termos de sexo e idade.

Como critérios de inclusão foram avaliados indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, portadores das formas aguda e crônica da Hepatite B. Em relação aos critérios de exclusão, não foram avaliados indivíduos com idade inferior a 18 anos de idade e portadores de outro tipo de Hepatite ou Doenças Virais como Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

As amostras biológicas, previstas para o desenvolvimento deste estudo, foram prontamente levadas ao laboratório de análises clínicas do Departamento de Ciências da Saúde do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), onde foi realizado o protocolo de extração de DNA no mesmo dia da coleta.

Posteriormente a extração o DNA foi armazenada em Freezer – 20°C até sua utilização para o estudo.

4.3 Avaliações dos polimorfismos gênicos

4.3.1 Extração e quantificação do DNA

As amostras de DNA foram obtidas a partir de amostras de sangue total colhido com anticoagulante EDTA e a extração de DNA foi adaptada a partir do método de "salting out" descrito por Maniatis e Munro (1989) (Quadro 1).

As quantificações das amostras foram realizadas através do aparelho NanoDrop® pipetando 1 µL da solução de DNA com água ultrapura. Os dados obtidos foram compilados para cálculos de correção de concentração para que se obtenha a quantidade ideal para a amplificação (80 ng/µL).

Quadro 1: Protocolo de extração de DNA adaptado do método de "Salting out" descrito por Maniatis e Munro (1989).

(Continua)

PIPETAR	750 µL de solução de lise de hemácias para um tubo tipo Eppendorf
ADICIONAR	750 µL de sangue total no tubo tipo eppendorf contendo a solução de lise de hemácias
INCUBAR	10 minutos à temperatura ambiente invertendo o tubo de 5 a 6 vezes durante a incubação
CENTRIFUGAR	14.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente e desprezar o sobrenadante
HOMOGENEIZAR	Vigorosamente com batidas no tubo, para ressuspender o pellet. Se o pellet ainda contiver hemácias adicionar mais 600µL de solução de lise e repetir o procedimento acima
ADICIONAR	<ul style="list-style-type: none"> • 500 µL da solução de lise nuclear (Solução 2 - Leucócitos) • 50 µl de SDS 10% (Eliminar as proteínas) • 10 µl de NaClO₄ 5 M (Precipitação do DNA)

Quadro 1: Protocolo de extração de DNA adaptado do método de “Salting out” descrito por Maniatis e Munro (1989).

(Conclusão)

HOMOGENEIZAR	Vigorosamente em agitador de tubos (vortex)
ADICIONAR	200 µl de solução de NaCl 6M
MISTURAR	20 a 30 segundos em Vortex
CENTRIFUGAR	14.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente
TRANSFERIR	O Sobrenadante para outro tubo tipo Eppendorf contendo 500µL de isopropanol e misturar no mínimo 20 vezes
CENTRIFUGAR	14.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente
DESPREZAR	O sobrenadante e adicionar 500µL de etanol a 70%, inverter o tubo várias vezes (Precipitado de DNA)
ESTOCAR	Freezer – 20°C

4.3.2 Reação de amplificação do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G.

A avaliação do polimorfismo de DEL/INS de 14 pb do gene HLA-G foi realizada através da reação de cadeia polimerase (PCR) utilizando os *primers* específicos HLAG8F – TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT e HLAG8R – GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT (Quadro 2 e 3).

Quadro 2: Concentrações de reagentes utilizados para a amplificação do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G.

Reagente	Concentração	Quantidade (uL)
Água		19,4
Tampão	10 X	2,5
MgCl ₂	0.75 mM	0,45
DNTP	10 mM	0,5
HLA-G8F	10 pM	0,5
HLA-G8R	10 pM	0,5
Taq <i>platinum</i> <i>Ivitrogen</i> ®	1U	0,2
DNA	80 ng	1

Quadro 3: Perfil de ciclagem do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G.

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	94° C	4'	1X
1. Denaturação	94° C	45"	
2. Pareamento	58° C	58"	32X
3. Extensão	72° C	72"	
	72° C	7'	1X
	4° C	∞	

4.3.3 Gel de eletroforese

Os produtos de amplificação foram submetidos à separação por eletroforese em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poliacrilamida (DEGHAIDE et al., 2009) (Quadro 4).

Quadro 4: Condições específicas para eletroforese do produto da amplificação do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G.

Loco	Gel	Voltagem	Tempo
DEL/INS 14 –pb	10% não desnaturante	200V	2:00 H

4.3.4. Coloração com nitrato de prata

Após ser retirado da placa, o gel foi colocado em 100 mL de solução fixadora acrescida de 1 mL de nitrato de prata (20 %), e mantida sob agitação à temperatura ambiente por cinco minutos. Depois desse tempo, a solução fixadora com prata foi descartada e o gel foi lavado com água. A água foi descartada e adicionou-se 100 mL de solução reveladora acrescida de 1 mL de formaldeído. O gel foi colocado sob agitação durante cinco minutos e então a solução fixadora acrescida de formaldeído foi descartada.

4.3.5. Registro dos resultados

Após eletroforese e coloração com Nitrato de Prata os géis foram revelados e fotografados para registro (Figura 7).

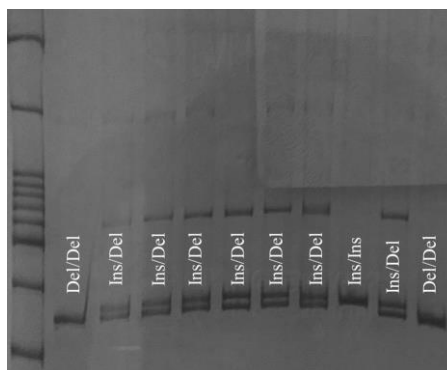


Figura 7: Gel de poliacrilamida resultante da amplificação do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb do éxon 8 da região não traduzida do gene HLA-G e seus possíveis genótipo.

4.3.6 Sequenciamento da região 3' não traduzida do gene HLA-G

Para a realização do sequenciamento todo o produto de PCR, resultante da amplificação do gene HLA-G foi diretamente submetido a uma reação de purificação com a enzima *ExoProStar™ 1 – Step* (GE Healthcare®) seguindo as seguintes proporções:

- Pipetar 4µL de produto de PCR
- Pipetar 1 µL de mix de *ExoProStar™ 1 – Step*

A solução resultante da digestão do produto de PCR com a enzima *ExoProStar™ 1 – Step* foi levado ao termociclador por 30 min conforme programa descrito na Quadro 5.

Quadro 5: Perfil de ciclagem para incubar a reação do produto de PCR com a enzima *ExoProStar™ 1 – Step*.

Estágios	Temperatura °C	Tempo	Ciclos
Incubação	37	15	1X
	80	15	1X
	4	∞	

Após a reação a digestão foi realizada a reação de preparação para o sequenciamento (Quadros 6, 7 e 8) com o primer HLA-G 8R, utilizando o *kit BigDye® terminator* versão 3.1 (*Applied Biosystems*), para posterior leitura deste produto de reação em um sequenciador automático ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*).

Quadro 6: Mix para realização da reação de sequenciamento.

Adicionar	
1,5 µL	Tampão do BigDye
1,0 µL	BigDye®
0,5 µL	Primer 8R
4 µL	Produto de Digestão com ExoProStar®
3 µL	Água ultrapura

Quadro 7: Perfil de ciclagem para reação do mix de sequenciamento.

Temperatura	Tempo	Ciclo
96	10''	1 X
96	10''	
50	6''	25 X
60	4'	
60	2''	1
4	∞	

Quadro 8: Protocolo de precipitação do produto da reação de sequenciamento.

ADICIONAR	1 µL de NaOAc 3 M (pH=4,5) e 20 µL de etanol absoluto gelado no produto da reação de sequenciamento
INCUBAR	- 20°C por 50'
CENTRIFUGAR	14000 rpm por 30' a 4°C e descartar o sobrenadante
ADICIONAR	50 µL de etanol 70% gelado
CENTRIFUGAR	14000 rpm por 5 min e descartar o sobrenadante
SECAR	A temperatura ambiente por até 12 horas ao abrigo da luz ou centrifugar a vácuo por 15'

4.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos no SINAN foram compilados no programa *Microsoft® Excel®* 2013 no qual foi calculado o índice para relacionar o número de habitantes de cada município com o número de casos, evitando assim, discrepâncias entre os valores brutos. Posteriormente os dados compilados foram submetidos a análises estatísticas no software estatístico *Primer®*, no qual, foi realizado o agrupamento hierárquico por similaridade (*Cluster*) e a técnica não métrica de escalonamento multidimensional (*MDS - Non Metric Multidimensional Scaling*).

Os valores de ocorrência numérica das análises de similaridade foram transformados pelo índice de similaridade de Bray-Curtis (CLARKE; WARWICK, 1994). Sendo assim o agrupamento hierárquico interligou as amostras por suas associações produzindo um dendograma e um gráfico, cujas amostras semelhantes, segundo os critérios escolhidos, agruparam-se entre si. Assim, quanto menor a distância entre os pontos, maior foi a semelhança entre as amostras.

Outros testes estatísticos foram aplicados aos dados coletados, sendo a análise de variância (ANOVA) por duas vias (*two-way*), seguida de teste *post-hoc* Bonferroni analisados através do software *Graphpad Prism®* (versão 5.01 CA, USA, 2000). Para essas análises foram considerados estatisticamente diferentes valores de $p < 0.05$. Por fim, os gráficos foram confeccionados através do programa *Microsoft® Excel®* 2013 e *Graphpad Prism®* (versão 5.01 CA, USA, 2000).

Por sua vez, para comparar a significância estatística das frequências alélicas e genóticas entre os grupos, foram utilizados softwares específicos, realizando testes de normalidade, após os quais foram escolhidos testes paramétricos ou não paramétricos para comparação entre grupos. Foram considerados valores de p estatisticamente diferentes daqueles cujos valores forem $< 0,05$.

A frequência alélica foi calculada a partir da divisão do número de alelos encontrados pelo total de alelos analisados e a frequência genotípica foi obtida como quociente do número de genótipos encontrados pelo número de indivíduos estudados.

As frequências alélicas e genóticas, resultantes do sequenciamento, foram calculadas por contagem direta utilizando o programa GENEPOP versão 3.4. Para análise estatística das tabelas de contenção, foi utilizado o teste exato de Fisher e *Odds Ratio*, calculados a partir do software *InStat®*3.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação epidemiológica preliminar do vírus da Hepatite B na região norte do Espírito Santo.

A primeira etapa de nosso estudo se baseou na coleta de dados epidemiológicos para responder dúvidas, em relação ao número de indivíduos infectados pelo vírus da Hepatite B na região norte do estado do Espírito Santo. Dessa forma, foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o assunto e uma análise junto a Superintendência Regional de Saúde do Município de São Mateus – ES (SESA-ES), que disponibilizou inicialmente informações referentes a Hepatite B através da base de dados SINAN no período de 2007 a 2013.

O número de notificações de casos de Hepatite B foi avaliado em todos os 11 municípios pertencentes à região norte do Espírito Santo. Os municípios de São Mateus, Pedro Canário e Jaguaré, apresentaram, proporcionalmente, os números mais expressivos de casos notificados de infecção pelo VHB no período de 2007 a 2013 (Figura 8).

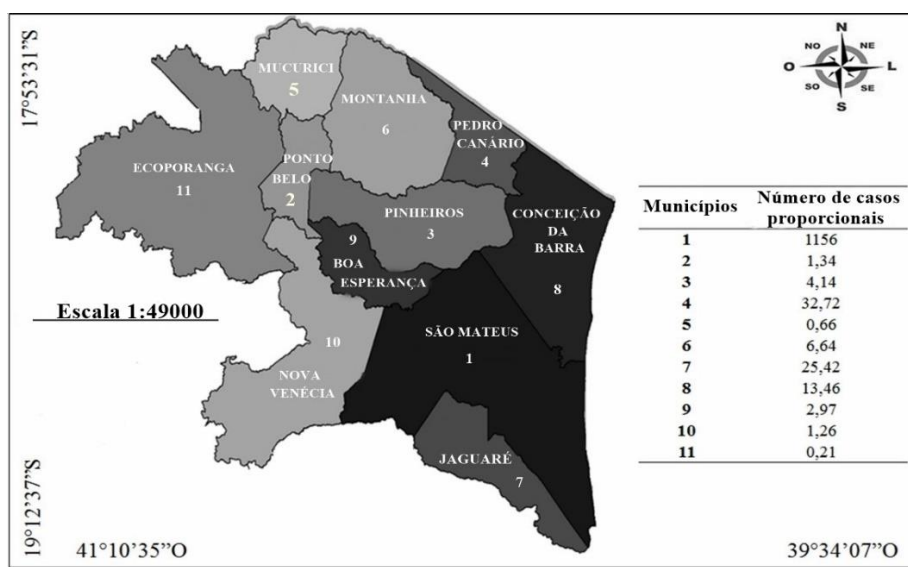


Figura 8: Localização cartográfica dos números de casos proporcionais de Hepatite B nos municípios da região norte do estado do Espírito Santo no período de 2007 a 2013.
Fonte: Adaptado BRASIL, 2010.

Em seguida foi realizada uma análise de similaridade, que determina que quanto menor for a distância maior a semelhança entre as amostras, onde foi

constatado que no ano de 2009 o número de casos foi destoante quando comparado aos demais anos avaliados. Em relação a 2009, este mostrou uma similaridade de apenas 40% com os demais períodos avaliados (Figura 9).

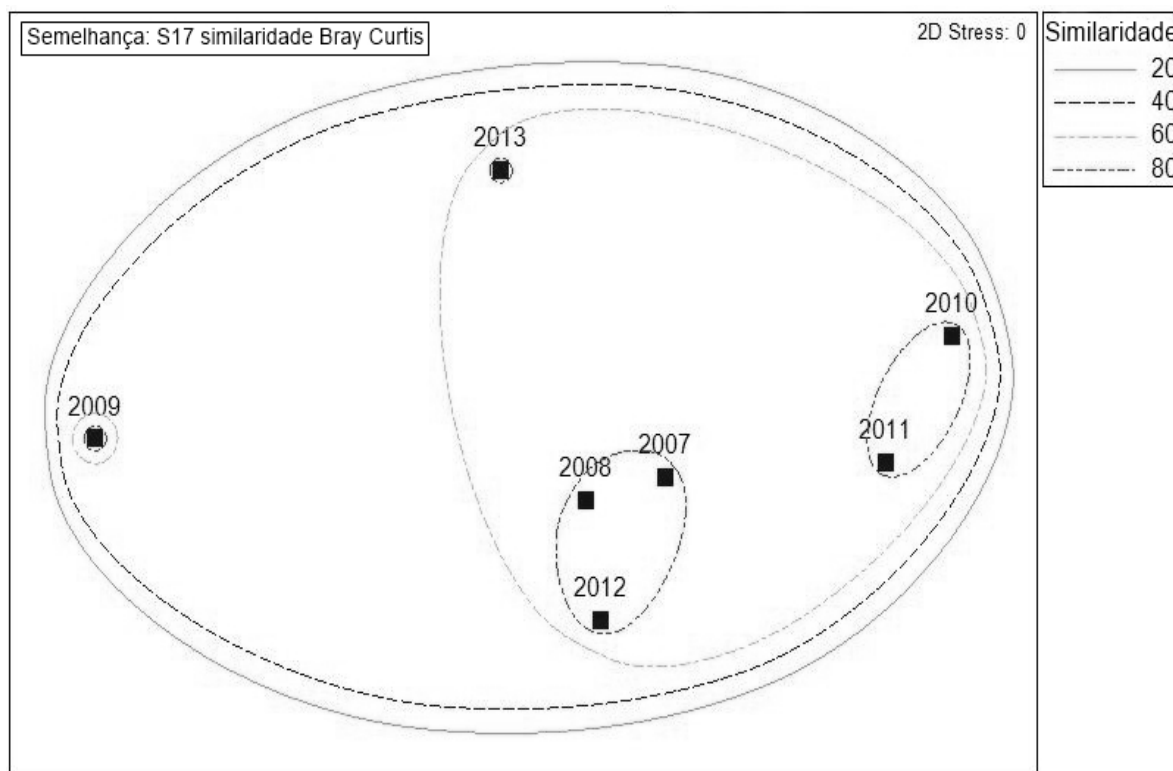


Figura 9: Non Metric Multidimensional Scaling (MDS) - Similaridade entre os anos correspondentes ao período de 2007 a 2013 nos municípios da região norte do estado do Espírito Santo.

Em 2013, como evidenciado na Figura 9, houve uma redução acentuada nos números de notificações, o que isolou este dado dos demais, apresentando assim uma similaridade de 60%. Já nos anos de 2007, 2008, 2010, 2011 e 2012 foi observada uma similaridade de 80%.

Tendo em vista os números de casos de todos os municípios da região norte do estado do Espírito Santo constatou-se que os municípios de São Mateus, Pedro Canário e Jaguaré apresentaram os maiores números de casos notificados de Hepatite B. O município de São Mateus apresentou apenas 20% de similaridade com os demais, já as cidades de Pedro Canário e Jaguaré apresentaram 80% de similaridade entre si, como evidenciado na Figura 10.

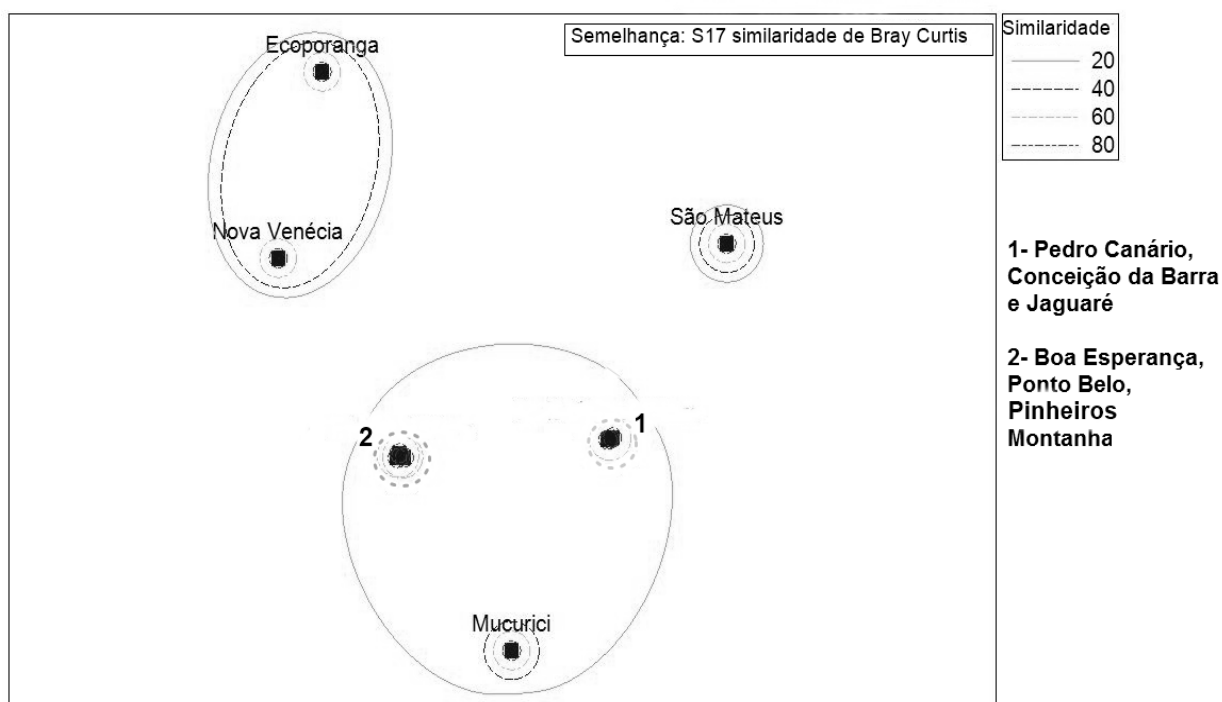


Figura 10: Non Metric Multidimensional Scaling (MDS) - Similaridade entre os municípios da região norte do estado do Espírito Santo quanto as notificações no período de 2007 a 2013.

A aplicação do teste ANOVA *two-way* seguido do *post-hoc* Bonferroni indicou que o município de São Mateus se destaca no número de notificações em comparação a Jaguaré e Pedro Canário, sendo esta comparação estatisticamente significativa ($p=0.0313$) nos anos correspondentes ao período de 2009 a 2013. As cidades de Jaguaré e Pedro Canário também foram testadas, porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os números de notificações no período analisado no presente estudo (Figura 11).

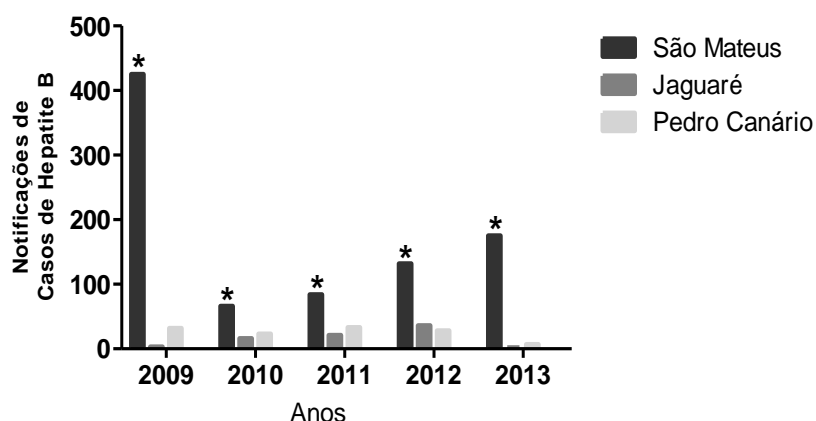


Figura 11: Estratificação dos números de notificações de Hepatite B nos municípios com maior percentual de casos na região norte do Espírito Santo no período de 2009 a 2013, * $p = 0.0313$.

5.2 Estratificações dos casos de Hepatite B no período de 2009 a 2013.

A faixa etária dos pacientes portadores de Hepatite B, foi estratificada pelo número de casos notificados, nos municípios que apresentaram maior número de notificações. Sendo assim, observou-se que a maioria das notificações para Hepatite B, estava na faixa etária entre 20 a 59 anos ($n=1204$). Entretanto, em relação aos municípios testados, Jaguaré e Pedro Canário não apresentaram diferenças quando comparados entre si. Por outro lado, quando analisado o município de São Mateus em comparação com os demais, observou-se uma diferença estatística significativa ($p=0.0017$) (Figura 12).

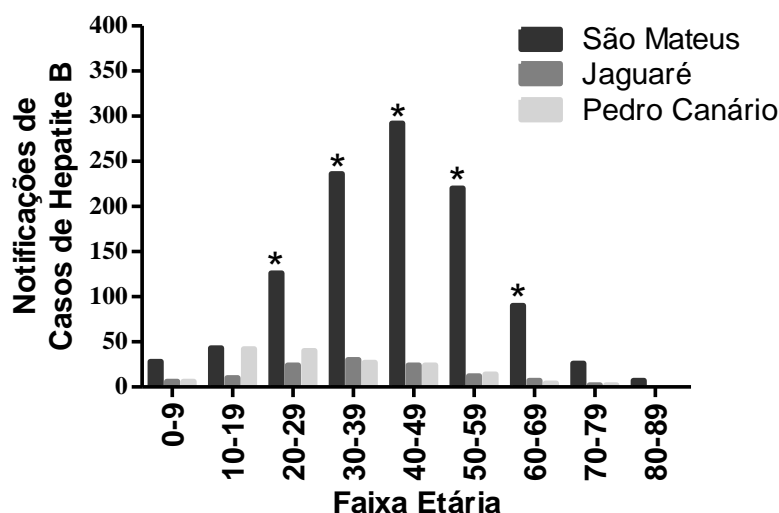


Figura 12: Estratificação por faixa etária dos números de notificações de Hepatite B nos municípios com os maiores percentuais de casos na região norte do Espírito Santo no período de 2007 a 2013, * $p=0.0017$.

A análise do variável sexo em relação ao número de notificações, considerou os três municípios que apresentaram os maiores números de casos de hepatite B (2007-2013). Após análise estatística, não foram encontradas diferenças significativas entre os municípios de Pedro Canário e Jaguaré, entretanto, assim como na análise por faixa etária, constatou-se uma diferença entre São Mateus e os demais municípios testados, $p=0.0106$ (Figura 13).

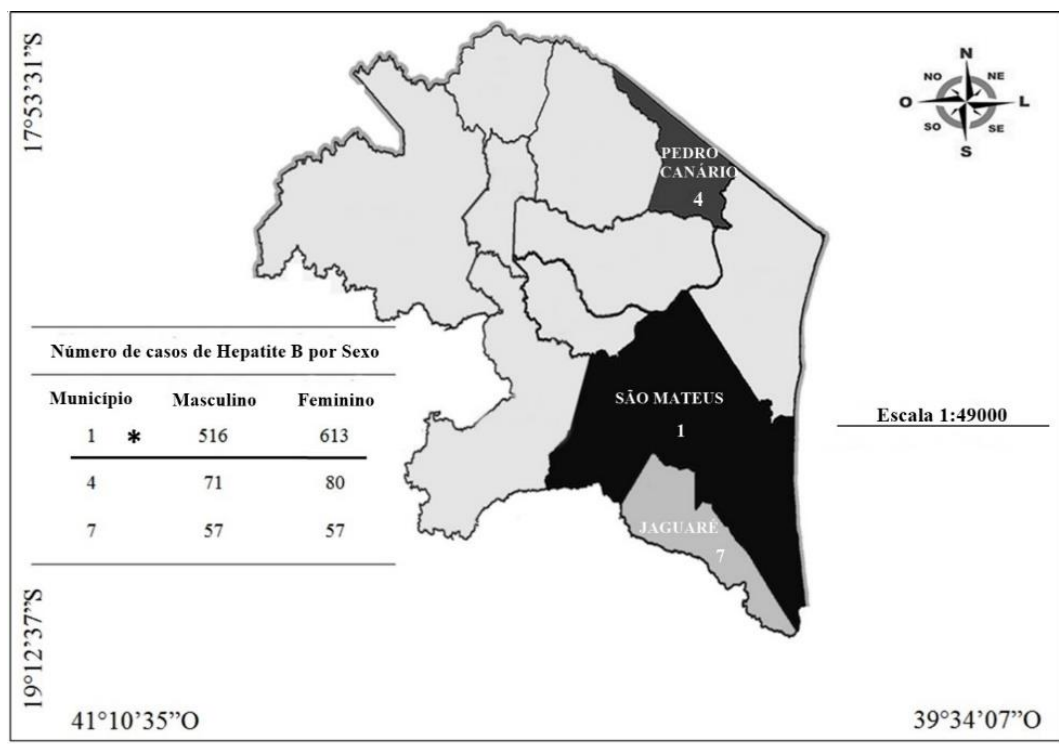


Figura 13: Localização cartográfica dos municípios da região norte que apresentaram os maiores números de casos de Hepatite B estratificados por sexo no período de 2007 a 2013, * $p=0,0106$.

Fonte: adaptado BRASIL, 2010.

Por fim, quanto à via de contato dos indivíduos portadores do VHB, foi constatado que o município de São Mateus não apresentou similaridade com os demais municípios da região norte quanto as possíveis formas de transmissão da hepatite B.

Conforme observado no dendograma (Figura 14), às principais formas de contato com o VHB foram através do uso de medicamentos injetáveis e tratamento dentário (aproximadamente 95% de similaridade) e contato domiciliar com outro portador do VHB (aproximadamente 90% de similaridade). Por outro lado, a forma de contato com o VHB na hemodiálise apresentou pouca similaridade com as outras formas de contato, sendo apenas cerca de 20%.

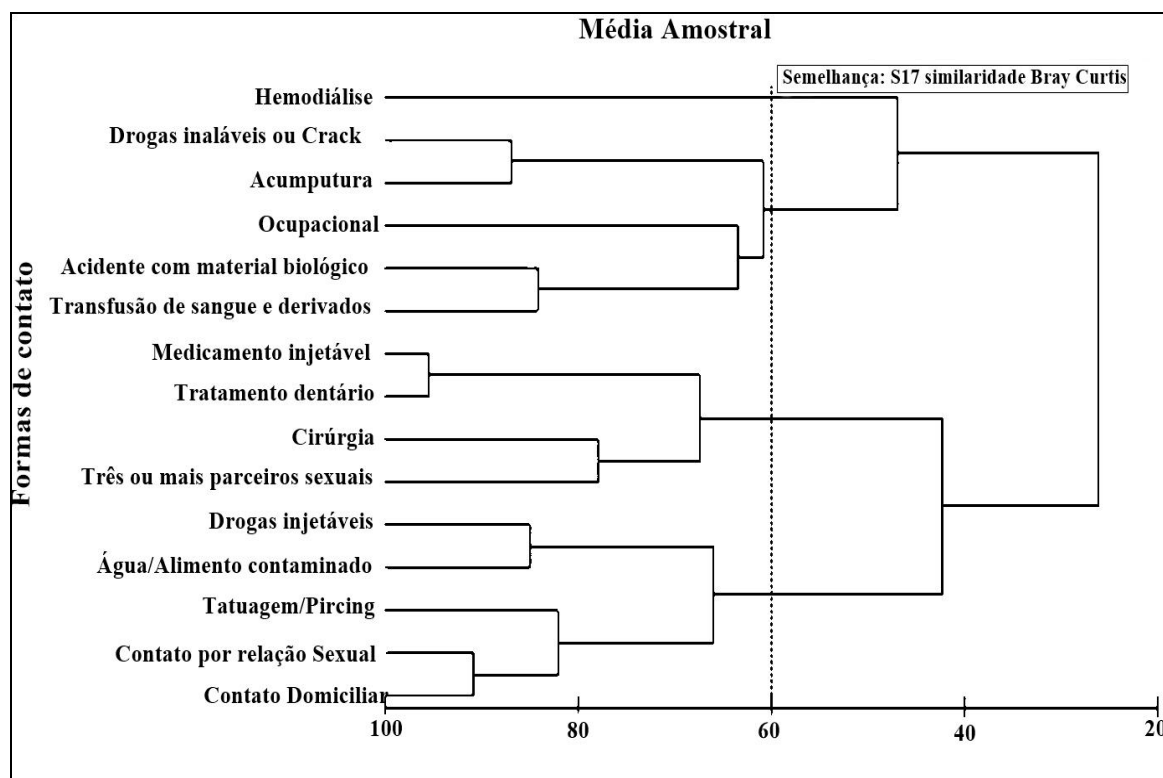


Figura 14: Dendograma representando as formas de contato da Hepatite B nos municípios da região norte do Espírito Santo no período de 2007 a 2013.

5.3 Avaliação epidemiológica do vírus da Hepatite B na região norte do Espírito Santo no ano de 2014 e 2015.

Nesse contexto, a análise epidemiológica foi estendida para os anos de 2014 e 2015 a fim de caracterizar melhor o perfil dos pacientes e identificar quais pacientes ainda estavam buscando atendimento no Centro Regional de Especialidades (CRE – São Mateus), no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA – São Mateus) e na Farmácia Cidadã do município de São Mateus-ES para posterior coleta de amostra biológica para obtenção de DNA para realização do estudo do polimorfismo da região de 3' UTR do gene HLA-G.

A princípio foi realizado uma análise complexa de prontuários médicos, com a finalidade de encontrar dados mais atualizados em relação ao número de doentes, idade, sexo, tratamento medicamentoso, adesão ou não ao tratamento, doenças decorrentes da infecção por hepatite B e formas clínicas da doença.

A partir da busca nos prontuários foi traçado um perfil dos pacientes atendidos pelo CRE – São Mateus, CTA – São Mateus e Farmácia Cidadã, a fim de elucidar quais eram as raças, os sexos e as faixas etárias médias mais acometidas

pelo VHB. Observou-se que os municípios de São Mateus e Jaguaré, pertencentes a região norte do Espírito Santo, foram os municípios com os maiores números de indivíduos infectados pelo VHB.

As raças mais acometidas com o VHB integravam indivíduos Pardos e Brancos, porém observamos um elevado percentual de indivíduos que não declararam sua raça. Em relação a variável sexo, o mais acometido predominantemente feminino, chegando a 100% dos indivíduos em alguns municípios (Pedro Canário, Mucurici e Ponto Belo). A faixa etária média predominou entre 42,5 a 46,5 anos (Tabela 1).

Tabela 1: Perfil dos pacientes atendidos pelo Centro Regional de Especialidades, Centro de Testagem e Aconselhamento e Farmácia Cidadã do município de São Mateus – Espírito Santo.

	Pacientes (n = 118)	Raça (%)				Sexo (%)		MI*/Sexo	
		P*	B*	N*	ND*	M*	F*	M	F
São Mateus	102	28,43	14,72	13,73	43,12	45,1	54,9	44	42,5
Jaguaré	7	14,28	57,15	0	28,57	42,9	57,1	42	32,5
Pedro Canário	2	0	50	0	50	0	100	0	35,5
Montanha	4	0	60	20	20	50	50	43	50
Mucurici	1	0	0	0	0	100	0	0	70
Ponto Belo	2	0	0	0	0	100	0	0	46,5

*P = Pardo; B = Branco; N = Negro; ND = Não Declarada; M = Masculino; F = Feminino; MI = Médias das Idades

Em relação às formas clínicas da Hepatite B (Tabela 2), constatou-se que a forma crônica da doença é a mais representativa, 68,64% (n=81) e merece destaque em todos os municípios que possuem pacientes atendidos no CRE-SM, principalmente em São Mateus – ES que possui 63,7% (n=65) dos pacientes diagnosticados com a forma crônica da infecção. Porém, ressalta-se que o número de pacientes em São Mateus, no qual a forma clínica da doença considerado indefinido foi expressivo, 31,37% (n=32).

Tabela 2: Número de casos de Hepatite B de acordo com a forma de evolução da hepatite B nos pacientes do Centro Regional de Especialidades de São Mateus (CRE-SM) a partir do município de residência.

Municípios	Hepatite B						Pacientes (N = 118)
	Aguda	%	Crônica	%	Indeterminado	%	
São Mateus	5	4,9	65	63,7	32	31,37	102
Jaguaré	0	0	7	100	0	0	7
Pedro Canário	0	0	2	100	0	0	2
Montanha	0	0	4	100	0	0	4
Mucurici	0	0	1	100	0	0	1
Ponto Belo	0	0	2	100	0	0	2
Total	5	4,24	81	68,64	32	27,12	118

No total de pacientes (n=56) portadores da forma crônica de Hepatite B, 30,36% (n=17) apresentaram ao menos uma complicação clínica decorrente da doença, sendo que 5 destes apresentaram quadro de Cirrose Hepática. Os demais no geral apresentam quadro clínico de Esteatose Hepática (Acúmulo de Gordura nas células do Fígado) ou Hepatomegalia (Aumento do Fígado). Não foram encontrados pacientes com HCC.

Outra análise relevante, tendo em vista a importância na indicação da terapia medicamentosa, foi o número de indivíduos estratificados de acordo com a carga viral dos níveis de DNA do VHB (VHB-DNA) no sangue (Tabela 3). Entre os pacientes analisados no presente estudo, 47,46% (n = 56) apresentaram níveis de VHB-DNA acima de 2000 UI/ML sendo, esses aptos à terapia medicamentosa.

Tabela 3: Estratificação de acordo com a carga viral dos níveis de VHB-DNA nos pacientes portadores de Hepatite B em tratamento no CRE-SM de acordo com o município de residência.

	Pacientes (N = 118)	< 2000 UI/mL (%)	> 2000 UI/mL (%)	NI* (%)	NR* (%)
São Mateus	102	20,59	40,2	4,9	34,31
Jaguaré	7	0	85,71	0	14,29
Pedro Canário	2	0	100	0	0
Montanha	4	0	100	0	0
Mucurici	1	0	100	0	0
Ponto Belo	2	0	100	0	0
Total	118	17,8	47,46	4,23	30,6

*NI = Não Informado; NR = Não Realizado

A maioria dos pacientes atendidos pelo CRE-SM, cerca de 69,49% realizou a quantificação da carga viral do VHB-DNA pelo menos uma vez durante o acompanhamento da doença no período de 2014-2015. Porém um número expressivo de indivíduos não realizou essa quantificação viral, 30,51%, mostrando desta forma que boa parte dos pacientes negligenciou o acompanhamento médico apesar da disponibilidade do profissional especializado e da realização de exames.

Em relação aos medicamentos da Hepatite B, disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento de portadores crônicos com carga viral > 2000 UI/mL. Os medicamentos Entecavir e Tenofovir foram os mais indicados nos municípios da região norte do Espírito Santo, totalizando respectivamente 4,24% (n=5) e 38,14% (n=45) (Tabela 4).

Tabela 4: Número de indivíduos portadores crônicos atendidos no CRE-SM de acordo com a carga viral e terapia nos municípios da Região norte do Espírito Santo.

	Pacientes	Tratamento (%)						ST*
		ETV*	INF- α *	LAV*	LAV+TDF**	LAV+ADF**	TDF*	
São Mateus	102	4,9	0,98	0,98	1,96	0,98	30,4	59,8
Jaguarié	7	0	0	0	0	0	85,71	14,29
Pedro Canário	2	0	0	0	0	0	100	0
Montanha	4	0	25	0	0	0	75	0
Mucurici	1	0	0	0	0	0	1	0
Ponto Belo	2	0	0	0	0	0	100	0
Total	118	4,24	1,69	0,85	1,69	0,85	38,14	52,54

*ETV = Entecavir; INF- α = Interferon- α ; LAV = Lamivudina; TDF = Tenofovir; ADF = Adefovir; ST = Sem Tratamento

**Associação de medicamentos

5.4 Polimorfismos gênicos

Tendo em vista o elevado número de indivíduos infectados nos municípios da região norte do estado Espírito Santo e a deficiência de estudos mais complexos sobre a possível influência dos polimorfismos da região 3' UTR (Del/Ins de 14-pb, + 3142 C/G, + 3001 C/T + 3187 A/G, + 3196 C/T, + 3003 C/T, + 3010C/G, + 3027 A/C, 3035 C/T) no escape desse vírus, favorecendo o processo de cronificação da doença. Neste estudo foram realizados experimentos para avaliar os polimorfismos do gene HLA-G.

O interesse inicial era abranger apenas essa população do norte do Espírito Santo, entretanto, surgiu a oportunidade de analisar juntamente com nossos dados, amostras de pacientes portadores crônicos do VHB do município de Cuibá, Mato

Grosso. Estas amostras foram gentilmente cedidas pela professora Carmen Lucia Bassi Branco.

5.4.1 Análises das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo de Del/Ins de 14 pares de bases na região 3' UTR do gene HLA-G.

Em relação às análises das frequências alélicas e genotípicas da região 3' não traduzida (3' UTR) foi realizado inicialmente o estudo dos sítios polimórficos de deleção-DEL/inserção-INS de 14 pares de bases (pb) e posteriormente o sequenciamento de toda essa região.

As frequências alélicas do polimorfismo de DEL/INS de 14-pb dentro do éxon 8 entre os sítios +2961 a +2974 na região 3' UTR do gene HLA-G, não foram diferentes entre os grupos testados. Mas, quando avaliado a distribuição das frequências genotípicas desse polimorfismo observamos os seguintes resultados (Tabela 5):

- **Genótipo DEL/DEL:** Em relação a este genótipo não ocorreram alterações estatisticamente significantes.
- **Genótipo DEL/INS:** O genótipo DEL/INS foi o mais frequente nos pacientes com Hepatite B ($p < 0,0194$; $OR = 1,645$; IC 95% = 1,101 a 2,458) quando comparado aos indivíduos controles.
- **Genótipo INS/INS:** Em relação a este genótipo não ocorreram alterações estatisticamente significantes.

Tabela 5: Distribuição das frequências alélica e genotípicas do polimorfismo de Deleção/Inserção de 14-pb entre as posições +2961 a +2974 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores Hepatite B crônica (n=195) e indivíduos controles (n=195).

14-pb DEL/INS	Pacientes		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
Deleção	220	56,41	228	58,46	$p = 0,6122$
Inserção	170	43,59	162	41,54	$p = 0,6122$
Genótipos					
Del/Del	59	30,25	75	38,46	$p = 0,1096$
Del/Ins	102	52,31	78	40,0	$p < 0,0194^*$
Ins/Ins	34	17,44	42	21,54	$p = 0,3709$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p=valor de P

Estratificando o estudo desse polimorfismo, através da relação de indivíduos portadores de Hepatite B com quadro clínico de cirrose hepática presente ou ausente, não foram observadas diferenças na distribuição alélica e fenotípica entre pacientes comparados entre si e pacientes testados em relação aos controles (Tabelas 6 e 7). Mostrando desta forma que as complicações clínicas não constituíram um componente determinante para diferenciar estatisticamente os grupos avaliados.

Tabela 6: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo de Deleção/Inserção de 14-pb entre as posições +2961 a +2974 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica com cirrose hepática (n=31) ou sem cirrose hepática (n=164).

14 pb DEL/INS	Pacientes com cirrose		Pacientes sem cirrose		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
Deleção	40	64,52	180	54,88	$p=0,1661$
Inserção	22	35,48	148	45,12	$p=0,1661$
Genótipos					
Del/Del	12	38,71	47	28,66	$p=0,2895$
Del/Ins	16	51,61	86	52,44	$p=1,0000$
Ins/Ins	3	9,68	31	18,9	$p=0,3033$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p=valor de P

Tabela 7: Distribuição das frequências alélica e genotípica do polimorfismo de Deleção/Inserção de 14-pb entre as posições +2961 a +2974 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica com cirrose hepática (n=31) e controles (n=195).

14 pb DEL/INS	Pacientes com cirrose		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
Deleção	40	64,52	228	58,46	$p=0,4057$
Inserção	22	35,48	162	41,54	$p=0,4057$
Genótipos					
Del/Del	12	38,71	75	38,46	$p=1,0000$
Del/Ins	16	51,61	78	40,0	$p=0,2435$
Ins/Ins	3	9,68	42	21,54	$p=0,1506$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p=valor de P

5.4.2 Análises das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região 3' UTR do gene HLA-G.

Através dos experimentos de sequenciamento da região 3' UTR do gene HLA-G pode-se avaliar outros sítios polimórficos que incluem: +3003 C/T, +3010 C/G, + 3027 C/A, +3035 C/T, + 3142 C/G, +3187 A/G e +3196 C/G.

5.4.2.1 Frequências Alélicas e Genotípicas do sítio polimórfico +3003 da região 3'UTR do gene HLA-G.

Em relação às frequências alélicas do polimorfismo de variação de Citosina ou Timina na posição + 3003 da região 3' não traduzida do gene HLA-G, não foram encontradas alterações estatisticamente significativas entre os grupos testados. Porém, na avaliação das frequências genotípicas desse polimorfismo, observamos os seguintes resultados (Tabela 8):

- **Genótipo C/C:** Em relação a este genótipo não ocorreram alterações estatisticamente significantes.
- **Genótipo C/T:** O genótipo foi menos frequente no grupo de pacientes com Hepatite B crônica ($p<0,0166$; $OR=0,5137$; IC 95%=0,2965 a 0,8900) quando comparado aos indivíduos controles.
- **Genótipo T/T:** O genótipo foi menos frequente nos indivíduos com Hepatite B crônica ($p<0,0468$; $OR=1,766$; IC 95%=1,031 a 3,023) quando comparado aos indivíduos controles.

Tabela 8: Frequências alélicas e genotípicas da variação polimórfica de Citosina ou Timina na posição +3003 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores Hepatite B crônica (n=164) e indivíduos controles (n=195).

+3003 C/T	Pacientes		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
C	27	8,23	47	12,05	$p=0,1091$
T	301	91,77	343	87,95	$p=0,1091$
Genótipos					
CC	2	1,49	0	0	$p=0,2080$
CT	23	14,02	47	24,10	$p<0,0166$
TT	139	84,49	148	75,9	$p<0,0468$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p=valor de P

5.4.2.2 Frequências Alélicas e Genotípicas do sítio polimórfico +3010 da região 3'UTR do gene HLA-G.

Tabela 9: Frequências alélicas e genotípicas da variação polimórfica de Citosina ou Guanina na posição +3010 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores do Vírus da Hepatite B (n=164) e indivíduos controles (n=195).

+3010 C/G	Pacientes		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
C	193	58,84	207	53,08	$p=0,1177$
G	135	41,16	183	46,92	$p=0,1317$
Genótipos					
CC	57	34,76	60	30,77	$p=0,4311$
CG	79	48,17	87	44,62	$p=0,5249$
GG	28	17,07	48	24,62	$p=0,0923$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p =valor de P

As frequências das tipificações do polimorfismo de SNP na posição 3010 da região não traduzida do gene HLA-G, em pacientes portadores de Hepatite B e controles, estão mostradas na Tabela 9. Não foram encontradas alterações estatisticamente significantes entre os grupos analisados.

5.4.2.3 Frequências Alélicas e Genotípicas do sítio +3027 da região 3'UTR do gene HLA-G.

Em relação as análises das frequências alélicas e genotípicas do SNP +3027 da região 3' UTR do gene HLA-G (AA, CA e CC), não foram encontradas alterações estatisticamente significantes (Tabela 10).

Tabela 10: Frequências alélicas e genótípicas da variação polimórfica de Citosina ou Adenina na posição +3027 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=164) e indivíduos controles (n=195).

+3027 C/A	Pacientes		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
A	309	93,85	368	94,02	$p=1,0000$
C	19	6,15	22	5,98	$p=1,0000$
Genótipos					
AA	146	89,02	174	89,23	$p=1,0000$
AC	17	10,37	20	10,26	$p=1,0000$
CC	1	0,61	1	0,51	$p=1,0000$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p=valor de P

5.4.2.4 Frequências Alélicas e Genótípicas do SNP +3035 da região 3'UTR do gene HLA-G.

As frequências alélicas e genótípicas do SNP +3035 da região 3' do gene HLA-G (CC, CT e TT), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, conforme mostrado na Tabela 11.

Tabela 11: Frequências alélicas e genótípicas da variação polimórfica de Citosina ou Timina na posição +3035 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=164) e indivíduos controles (n=195).

+3035 C/T	Pacientes		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
C	286	87,19	331	84,87	$p=0,3904$
T	42	12,81	59	15,13	$p=0,3904$
Genótipos					
CC	126	76,83	142	72,82	$p=0,3968$
CT	34	20,73	47	24,10	$p=0,5264$
TT	4	4,44	6	3,08	$p=0,7598$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p=valor de P

5.4.2.5 Frequências Alélicas e Genotípicas do SNP +3142 da região 3'UTR do gene HLA-G.

As frequências das tipificações dos polimorfismos dos alelos e genótipos do SNP +3142 da região 3' UTR do gene HLA-G (CC, CG e GG) podem ser observadas na Tabela 12. Não foram encontradas alterações estatisticamente significativas entre os grupos analisados.

Tabela 12: Frequências alélica e genotípica da variação polimórfica de Citosina ou Guanina na posição +3142 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=164) e indivíduos controles (n=195).

+3142 G/C	Pacientes		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
C	140	42,94	177	45,38	$p=0,7274$
G	186	57,06	213	54,62	$p=0,5458$
Genótipos					
CC	30	18,4	42	21,54	$p=0,5091$
CG	80	49,08	93	47,69	$p=0,8321$
GG	53	32,52	60	30,77	$p=0,7333$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p =valor de P

5.4.2.6 Frequências Alélicas e Genotípicas do SNP +3187 da região 3'UTR do gene HLA-G.

Em relação as análises das frequências alélicas e genotípicas do SNP +3187 na região 3' UTR mais especificamente na região *AU - Rich motifs* do gene HLA-G, não foram encontrados diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Tabela 13).

Tabela 13: Frequências alélicas e genótípicas da variação polimórfica de Adenina ou Guanina na posição +3187 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=161) e indivíduos controles (n=195).

+3187 A/G	Pacientes		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
A	239	74,22	288	73,85	$p=0,9317$
G	83	25,78	102	26,15	$p=0,9317$
Genótipos					
AA	86	53,42	104	53,33	$p=1,0000$
AG	67	41,61	80	41,03	$p=0,9144$
GG	8	4,97	11	5,64	$p=0,8175$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p =valor de P

5.4.2.7 Frequências Alélicas e Genótípicas do SNP +3196 da região 3'UTR do gene HLA-G.

As análises das frequências alélicas +3196 da região 3'UTR do gene HLA-G em pacientes com Hepatite B e indivíduos controles estão mostradas na Tabela 22:

- **+3196C:** O alelo foi mais frequente no grupo de indivíduos controles ($p<0,0130$; OR=0,6493; IC 95%= 0,4626 a 0,9113) quando comparado aos indivíduos portadores da Hepatite B crônica.
- **+3196G:** O alelo foi mais frequente no grupo de indivíduos portadores da Hepatite B crônica ($p<0,0130$; OR=1,540; IC 95%=1,097 a 2,162) quando comparado aos indivíduos controles.

Em relação ao polimorfismo de variação de Citosina (C) ou Guanina (G) na posição +3196 da região 3' UTR mais especificamente na região de *AU-Rich motifs* do gene HLA-G, mostrou-se estatisticamente diferente em umas das frequências genótípicas estudadas, obtendo os seguintes resultados (Tabela 14):

- **Genótipo C/C:** o genótipo foi menos frequente nos indivíduos portadores da Hepatite B crônica ($p<0,0110$; OR=0,5643; IC95%=0,3634 a 0,8763) quando comparado aos indivíduos controles.

- **Genótipo C/G:** Apesar de ser o genótipo com maior proporção entre os indivíduos portadores de VHB este genótipo não apresentou diferenças estatisticamente significantes.
- **Genótipo G/G:** O genótipo G/G apresentou-se em menor proporção tanto nos pacientes quanto nos controles saudáveis, mas apesar disso, não se mostrou estatisticamente diferente.

Tabela 14: Frequências alélicas e genótípicas da variação polimórfica de Citosina ou Guanina na posição +3196 na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes portadores de Hepatite B crônica (n=161) e indivíduos controles (n=163).

+3196 C/G	Pacientes		Controles		Teste exato de Fisher
	n	Frequência (%)	n	Frequência (%)	
Alelos					
C	211	65,53	243	74,54	$p<0,0130$
G	111	34,47	83	25,46	$p<0,0130$
Genótipos					
CC	68	42,24	92	56,44	$p<0,0110$
CG	75	46,58	59	36,2	$p=0,0709$
GG	18	11,18	12	7,36	$p=0,2556$

n=número de alelos e genótipos; frequência=frequência alélica e genotípica; p =valor de P

6. DISCUSSÃO

Segundo Ferreira e Silveira (2004), existem poucos estudos voltados a Hepatite B no Brasil e quando existem se referem a grupos específicos. O estado Espírito Santo não se difere do Brasil neste sentido, pois há uma deficiência em estudos sobre esta doença especificamente na região norte, mesmo sendo uma região com um número elevado indivíduos infectados.

O presente estudo observou no período de 2007-2015, que de todos os municípios pertencentes à região norte do estado, três municípios destoaram dos demais em números de notificações, sendo eles São Mateus, Pedro Canário e Jaguaré. Esse fato pode estar relacionado a uma ineficiência dos sistemas de notificação dos demais municípios como relatado no Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais do Ministério da Saúde (Brasil, 2012) ou a uma baixa incidência de casos de Hepatite B em algumas localidades.

A cidade de São Mateus, no período correspondente deste estudo, apresentou números bem superiores aos demais municípios. Tal fato pode ser explicado por São Mateus abrigar uma das sedes da Superintendência Regional de Saúde da Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo e ser considerado o município de referência em saúde na região norte, uma vez que realiza toda a parte assistencial voltada aos indivíduos portadores do vírus da Hepatite B (VHB) dos demais municípios.

Outra explicação plausível para o índice de indivíduos infectados ser mais elevado no município de São Mateus pode estar relacionado ao fato de existir um hemocentro, pois segundo estudo realizado por Costa e colaboradores (2012), todas as regiões brasileiras que apresentam este tipo de estrutura possuem uma taxa média de detecção de Hepatite B mais elevada que nas demais localidades que não contam com este tipo de serviço, pois os hemocentros permitem um maior acesso da população a diagnósticos laboratoriais.

Em relação a avaliação da faixa etária, a idade média mais acometida pela doença entre os indivíduos estudados foi de 30 a 59 anos. No Brasil e na região sudeste a faixa etária entre 20 a 59 anos é a mais acometida com a infecção (BRASIL, 2012) corroborando parcialmente com os nossos resultados.

Além disso, no Brasil as faixas etárias mais acometidas variam por sexo, sendo 40 a 69 anos para o masculino e 15 a 39 anos para o feminino (COSTA; PAULA; IGNOTTI, 2012). A maior detecção nessa faixa etária para o sexo feminino tem relação direta com os fatores de risco como a multiplicidade de parceiros sexuais, relação sem preservativo e práticas da comercialização da atividade sexual (FIGUEIREDO et al., 2008; COSTA; PAULA; IGNOTTI, 2012).

Por sua vez, os achados referentes a faixa etária mais acometida 40 a 69 anos no sexo masculino (COSTA; PAULA; IGNOTTI, 2012) estão relacionados a fatores que incluem atividade sexuais extraconjugais sem uso de preservativo (LUKSAMIJARULKUL; KAEPAN; KLAMPHAKORN, 2007; COSTA; PAULA; IGNOTTI, 2012).

No geral a detecção dos números de casos de VHB se torna maior a partir dos 15 anos idade para todas as regiões brasileiras e ambos os sexos (COSTA; PAULA; IGNOTTI, 2012). Isso ocorre, provavelmente, pelo estilo de vida desses indivíduos que oferece mais riscos quanto à transmissão, principalmente quando se diz respeito à atividade sexual e o número de parceiros, além de comportamento ilícitos como o compartilhamento de seringas na utilização de drogas (CHÁVEZ; CAMPANA; HAAS, 2003; PEREIRA et al., 2009; COSTA; PAULA; IGNOTTI, 2012).

Apesar dos resultados encontrados corroborarem no aspecto das faixas etárias mais acometidas pela infecção do VHB com outros estudos, o mesmo não é visto quando comparamos os resultados do sexo mais acometido nos municípios da região norte. A maior proporção de mulheres infectadas encontrada no estudo destoava da realidade nacional, na qual, o sexo masculino é responsável pelos maiores números da doença no Brasil (BRASIL, 2012). Porém, estudos anteriores verificaram que apesar do maior índice de indivíduos infectados serem do sexo masculino, esses não apresentaram diferença estatisticamente significativas quanto ao sexo feminino no Brasil e na região sudeste (CLEMENS et al., 2000).

Entretanto, em no estudo, observou-se diferenças significativas quando comparamos os índices de indivíduos infectados do sexo feminino da cidade de São Mateus (maior número de notificações) com as cidades de Pedro Canário e Jaguaré também pertencentes a região norte do estado do Espírito Santo.

Em relação à forma de contato dos indivíduos com o vírus, observa-se que foram através do uso de medicamentos injetáveis e tratamento dentário, com aproximadamente 95% de similaridade entre eles, pela forma sexual e através do

contato domiciliar com outro portador do VHB, tendo aproximadamente 90% de similaridade entre eles. Além disso, a forma de contato com o VHB na hemodiálise apresentou pouca similaridade com as outras formas de contato, sendo apenas cerca de 20%.

Em estudo realizado por Melo-Brasil e colaboradores (2003), foi demonstrado que do total da população estudada no estado da Amazônia, 24,6% alegaram exposição a área endêmica e 15,5% desta população analisada contraíram a infecção pelo VHB através de exposição percutânea. Os resultados encontrados no presente estudo se diferenciam dos dados encontrados por Melo-Brasil e colaboradores (2003).

Através de uma avaliação epidemiológica preliminar de Hepatite B nos municípios da região norte do Espírito Santo, referente ao período de 2007 a 2013, ficou claro que essa patologia possui um expressivo número de casos, sendo um total de 1594 indivíduos infectados por este vírus. Porém, através da análise dos prontuários constatou-se que apesar desse elevado número, poucos indivíduos procuram o serviço de saúde pública oferecido no CRE - São Mateus, pois conforme observou-se no presente estudo somente 118 pacientes realizam o devido acompanhamento médico necessário com especialista.

O reduzido número de pacientes que procuraram ao menos uma vez atendimento no CRE – São Mateus pode estar relacionado à logística do serviço de saúde de outros municípios da região norte, que podem estar encaminhando seus pacientes para outros Centros Regionais de Especialidades do Estado ou para o Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes da Universidade Federal do Espírito Santo.

Segundo as informações da Superintendência Regional de Saúde, o município de Nova Venécia, por exemplo, encaminha seus pacientes para o CRE - Colatina. Dessa forma, essa diferença de lugares, no que diz respeito ao atendimento destes pacientes, ocasiona o número reduzido de notificações em alguns municípios no norte do estado do Espírito Santo.

Porém ressalta-se que através da vivência no CRE, CTA e Farmácia Cidadã do município de São Mateus foi constatado que além da questão de atendimento, há também uma baixa adesão dos pacientes em todos os aspectos. Uma realidade comumente encontrada, principalmente no CRE nos dias de consulta médica, era a falta de pacientes, mesmo existindo horário disponível e profissional habilitado, com

especialização em infectologia. Este resultado mostra a carência de medidas e programas que deveriam ser tomadas pelos gestores de saúde dos municípios na importância dos pacientes realizarem o acompanhamento médico nessa condição patológica.

Apesar do número reduzido de prontuários, tendo em vista o elevado número de indivíduos notificados com o VHB, buscou-se avaliar o perfil dos pacientes infectados através dessa ferramenta. Observou-se que dentre os indivíduos acompanhados, a grande maioria eram das cores parda e branca. Todavia, observou-se que o número de indivíduos com a cor não declarada é elevado, o que caracteriza falhas na notificação e preenchimento das bases de dados.

A caracterização da etnia constitui um papel importante no presente estudo, pois Gomez e colaboradores (2014), demonstraram que numa população, com indivíduos predominantemente negros, existe uma alta variabilidade genética decorrente de processos migratórios antigos e modernos. Além disso, demonstrou-se que neste perfil de população, em decorrência de seleção natural, existe uma alta frequência de polimorfismos gênicos que influenciam em patologias como Malária, Diabetes Mellitus Tipo II entre outros tipos de doenças.

Neste contexto, considerando que o município de São Mateus, apesar do predomínio de indivíduos das cores branca e parda como encontrado em nosso estudo, possui um número considerável de indivíduos negros, decorrentes do processo histórico desse município na comercialização de escravos e na formação das comunidades quilombolas existentes até hoje nos municípios da região norte do Espírito Santo (NARDOTO; LIMA, 2001; DAMAZIO et al., 2013). Dessa forma, os indivíduos residentes nos municípios da região norte do Espírito Santo, devido a colonização podem possuir, maior suscetibilidade genética a algumas doenças, entre essas doenças virais como Hepatite B.

No que se refere às análises das formas clínicas do VHB, a presença da forma crônica da hepatite B, conforme observou-se nos resultados, foi a mais encontrada nos pacientes atendidos no CRE - São Mateus e no Hospital Universitário Júlio Muller no município de Cuiba, Mato Grosso. O município de São Mateus-ES foi a única cidade que não apresentou 100% dos pacientes com a forma crônica, já que 31,37% dos indivíduos infectados foram considerados com quadro clínico indefinido de acordo com o diagnóstico, pois faltavam dados de exames complementares, apresentando apenas resultados referentes à presença de algum

marcador sorológico indicativo de infecção pelo VHB. Esta indefinição no diagnóstico pode estar relacionada ao fato da Hepatite B ser uma doença de progressão silenciosa, ou seja, assintomática em alguns casos (MCMAHON et al., 1985; WRIGHT; LAU, 1993; GANEM; PRINCE, 2004; SAMAL; KANDPAL; VIVEKANANDAN, 2012). Esta característica da doença possivelmente pode influenciar na baixa procura aos serviços de saúde, uma vez que, aparentemente alguns indivíduos não apresentam alterações patológicas severas e normalmente a doença de perfil assintomático (ANDERSEN, 1995).

A respeito da quantificação da carga viral, foi possível observar que 56 dos pacientes analisados apresentaram valores acima de 2000 UI/mL. Segundo o Ministério da Saúde, através das diretrizes para o tratamento da hepatite B elaborado no ano de 2011, pacientes virgens de tratamento com valores acima de 2000 UI/mL devem ser indicados a terapia medicamentosa independentemente da biopsia hepática (BRASIL, 2011).

Dessa forma, segundo os dados apresentados, possivelmente 56 pacientes deveriam estar fazendo uso das medicações indicadas para o tratamento, porém em um levantamento realizado junto a Farmácia Cidadã da cidade de São Mateus, responsável pela dispensação dessas medicações para todos os municípios da região norte, apenas 44 pacientes estavam buscando essas medicações e seguindo tratamento regularmente, este fato mostra uma baixa adesão dos pacientes ao tratamento e acompanhamento médico.

Segundo o Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos (2016), fabricante este do Fumarato de Tenofovir Desoproxila, medicamento mais utilizado no tratamento da hepatite B entre os pacientes da região norte do Espírito Santo. Esse fármaco apresenta efeitos colaterais que incluem principalmente: vertigem, eventos gastrointestinais leves a moderados, erupção cutânea (manchas vermelhas e placas pelo corpo, coceira), dor de cabeça, dor, diarreia, depressão, fraqueza e náuseas. Tendo em vista que os efeitos adversos à esta medicação são extremamente desagradáveis, podem ser considerados um dos motivos pelos quais existe uma baixa adesão ao tratamento nos indivíduos portadores do VHB da região norte do Espírito Santo.

Em estudo realizado por Melchior e colaboradores (2007), acerca da adesão à terapia com antirretrovirais, constatou-se que todos os indivíduos envolvidos no estudo relataram dificuldades ao uso da medicação abandonando a terapia ao

menos uma vez. Os fatores sociais e culturais são os mais difíceis de serem superados para adesão ao tratamento de determinados grupos de doenças, dessa forma destaca-se a importância da participação de ações de saúde promovidas pelo setor público (MELCHIOR et al., 2007).

Em relação ao tratamento medicamentoso utilizado pelos pacientes atendidos no CRE - São Mateus, as medicações mais prescritas foram Entecavir e o Tenofovir. De acordo com a Associação Europeia de Estudo do Fígado - EASL (2012) esses medicamentos são indicados como a primeira linha de tratamento contra a infecção, pois são os análogos nucleosídicos com maior potência, promovendo uma imunossupressão mais profunda e durável, além de criar uma barreira genética mais ampla contra a resistência viral (EASL, 2012).

O estudo de Batirel e colaboradores (2014), comparou a ação dos medicamentos Tenofovir e do Entecavir em pacientes com elevadas cargas virais de VHB-DNA na Turquia, observaram que 36% dos pacientes com Hepatite B que faziam uso de TDF normalizaram as funções hepáticas e apresentaram carga viral indetectável nos primeiros 3 meses de tratamento. Desta forma, o tratamento realizado com Tenofovir foi mais efetivo quando comparado ao Entecavir. Esses dados refletem a eficiência do medicamento Tenofovir no tratamento da Hepatite B e demonstram que possivelmente os pacientes que utilizam este medicamento em São Mateus, apresentam melhores resultados no tratamento da Hepatite B.

Considerando a análise preliminar sobre os indivíduos infectados pelo VHB nos municípios da região norte do estado do Espírito Santo, observou-se que apesar do elevado número de indivíduos notificados como portadores do vírus, poucos realizam o tratamento e acompanhamento médico. Nesse sentido surgiu a oportunidade de uma parceria com o intuito de enriquecer a análise do polimorfismo gênico. Dessa forma, além dos pacientes dos municípios da região norte do Espírito Santo (40 pacientes), o presente estudo contou com a inclusão de pacientes do município de Cuibá (155 pacientes), Mato Grosso (MT).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da Hepatite B, promovem diversas alterações no sistema imunológico nas formas agudas e crônica das doenças (HANSEN; BOUVIER, 2009; CATAMO et al., 2014), e que essas alterações podem resultar em algumas complicações clínicas como cirrose hepática e HCC (GANEM; PRINCE, 2004), escolhemos tipificar os sítios polimórficos da região 3' UTR do gene

HLA-G devido as ações que esta molécula imunorregulatória podem desenvolver no sistema imunológico.

Neste sentido é importante ressaltar que os vírus desenvolvem diversas formas de defesa frente ao sistema imune do hospedeiro para prosseguir infectando, sendo capazes de inibir a expressão do MHC de classe I na superfície da célula, dificultando o reconhecimento da célula e consequentemente a lise de células infectadas por linfócitos T CD8+ (HANSEN; BOUVIER, 2009; CATAMO et al., 2014).

A regulação da expressão de moléculas MHC de classe I expõe as células infectadas a ação citotóxica realizada pelas células NK (ONNO et al., 2000; LOZANO et al., 2002; CATAMO et al., 2014), porém para se proteger da ação dessa e de outras células do sistema imunológico (LE GAL et al., 1999; HANSEN; BOUVIER, 2009; CATAMO et al., 2014). Os vírus, assim como os tumores, têm desenvolvido mecanismos para impedir o reconhecimento das células NK como, por exemplo, através expressão induzida de moléculas de HLA-G nas células infectadas (ONNO et al., 2000).

Esse mecanismo pode suprimir a função de várias células do sistema imune (PARK et al., 2004) como, por exemplo, a inibição da citotoxicidade dos Linfócitos T CD8+, maturação de células dendríticas e indução de secreção de citocinas favorecendo um perfil de resposta imune desempenhada por linfócitos T do subtipo T *helper*-2 (Th-2) (LESPORT et al., 2009; CAROSELLA et al., 2008; LAARIBI et al., 2015). Esse processo contribui para uma maior suscetibilidade e persistência de infecções virais como HIV e Hepatites B e C (DONADI et al., 2011).

A expressão das isoformas solúveis ou de membrana da molécula HLA-G, pode ser influenciada em condições fisiológicas quanto em condições patológicas pelas regiões reguladoras do gene, como a região 3' UTR do gene HLA-G (DONADI et al., 2011). No fígado, órgão mais acometido nas hepatites virais, a expressão das isoformas de HLA-G foi observada nos hepatócitos e células epiteliais biliares de portadores de Hepatite B crônica (JIANG et al., 2011) e em mastócitos hepáticos de portadores de Hepatite C crônica (AMIOT et al., 2014). A presença dos mastócitos expressando HLA-G no fígado possui correlação com a fibrose nesse tecido (AMIOT et al., 2014). As citocinas envolvidas com a fibrose do fígado atuam como quimioatrativo e ativador dos mastócitos (IKURA et al., 2007; AMIOT; VU; SAMSON, 2015). Acredita-se que a análise da expressão do HLA-G a partir da contagem de mastócitos expressando essa molécula possa auxiliar como um marcador de fibrose

no tecido hepático (AMIOT et al., 2014) por isso a importância em estudar os mecanismos que influenciam essa expressão se tornam importantes.

Um dos polimorfismos presentes na região 3' UTR do gene HLA-G é o de presença ou ausência de 14 pares de bases Deleção(Del)/Inserção(Ins), este sítio polimórfico possui 3 variações genótípicas possíveis sendo elas Del/Del, Del/Ins e Ins/Ins. Estes genótipos podem ser relacionados com o aumento ou diminuição na expressão das isoformas solúveis e de membrana de HLA-G. O genótipo Ins/Ins está relacionado a níveis reduzidos de RNA mensageiro (RNAm) e consequentemente redução na expressão de isoformas proteicas de HLA-G (HIBY et al., 1999; HVIID et al., 2003; TAN et al., 2007; CASTELLI et al., 2009; RIZZO et al., 2012). Entretanto os genótipos Del/Del e Ins/Del são responsáveis por um aumento dos níveis de RNAm resultando em aumento da expressão das isoformas solúveis de HLA-G (HLA-G5 a HLA-G7) (RIZZO et al., 2012; DJURISIC; SØRENSEN; HVIID, 2012; LAARIBI et al., 2015).

O aumento ou a redução da expressão de HLA-G pode estar relacionada com a afinidade de miRNAs pela região polimórfica de Del/Ins de 14-pb entre a posição +2961 e +2974 na região 3' UTR do *HLA-G*. Sabe-se, através de estudo *in silico*, que a consequência final da ação do miRNA sobre a produção do RNAm de *HLA-G* pela presença/inserção alélica de 14pb seria mais rigorosa do que a produção de RNAm pela ausência/deleção de 14pb, o que poderia explicar a diminuição da produção de HLA-G na inserção de 14pb (CASTELLI et al., 2009).

Acerca da análise do polimorfismo gênico de Del/Ins dos 14pb na região 3' não traduzida do gene HLA-G, não observamos diferenças estatisticamente significativas em relação as frequências alélicas para Del e Ins entre pacientes com Hepatite B comparados aos indivíduos controles. Kim e colaboradores (2013), assim como no presente estudo, não encontraram diferenças estatísticas significantes nas frequências alélicas de portadores de Hepatite B crônica da Coreia do Sul. Em estudo realizado por Laaribi e colaboradores (2015) sobre a frequência alélica deste polimorfismo em tunisianos portadores crônicos do VHB, observou diferenças em relação a presença dos alelos Del e Ins em indivíduos controles, quando comparados a pacientes portadores de Hepatite B crônica estratificados por elevada carga viral. Os resultados diferem-se de Jiang e colaboradores (2011), no qual observaram diferenças em relação a frequências alélicas Del e Ins em chineses portadores crônicos do VHB com HCC quando comparados aos controles.

Em relação à frequência genotípica do polimorfismo de Del/Ins de 14-pb na região 3' não traduzida do gene HLA-G, observou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao genótipo Del/Ins nos pacientes portadores de hepatite B crônica comparado aos controles. Contudo em estudo realizado na Coreia do Sul não foram observadas diferenças estatísticas na análise frequência genotípica (KIM et al., 2013). Estudos realizados em chineses (JIANG et al., 2011) e turcos (LAARIBI et al., 2015) portadores crônicos de Hepatite B encontraram resultados semelhantes. Nestes trabalhos a análise do polimorfismo mostrou que os indivíduos controles apresentaram prevalência do genótipo Ins/Ins quando comparados aos pacientes portadores de Hepatite B crônica com HCC e Portadores de Hepatite B crônica estratificados através da carga viral elevada respectivamente.

Em relação aos estudos da influência das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo de Del/Ins de 14-pb na região 3' UTR em pacientes portadores de Hepatite B crônica, evidências na literatura apontam que o alelo Ins e os genótipo de Del/Ins e Ins/Ins estão associados a diminuição do risco de desenvolver HCC (JIANG et al., 2011). Entretanto Laaribi e colaboradores (2015), associaram frequência alélica Ins com uma maior replicação viral em portadores crônicos da hepatite B.

O presente estudo observou que os indivíduos com Hepatite B que apresentaram genótipo Del/Ins foram associados a um maior risco de desenvolvimento da forma crônica da Hepatite B. Porém não encontrou-se relação das frequências alélicas e genotípicas com possíveis complicações clínicas como a Cirrose Hepática, Esteatose Hepática e HCC decorrentes da infecção pelo VHB.

A influência do polimorfismo de Del/Ins de 14-pb na região 3' não traduzida vem sendo amplamente estudada em diversas situações clínicas, como por exemplo: doenças autoimunes (JEONG et al., 2014; KIM et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016; GERASIMOU et al., 2016; HASHEMI et al., 2016), rejeição de implantes embrionários (ENGHELABIFAR et al., 2014; NARDI et al., 2016), câncer (ESKANDARI-NASAB et al., 2013; TEXEIRA et al., 2013; GE et al., 2014; LIN; YAN, 2015; HAGHI et al., 2015), abortos recorrentes (WANG; JIANG; ZHANG, 2013; AL OMAR et al., 2015), pré-eclampsia (PABALAN et al., 2015), infecção bacteriana por *helicobacter pylori* (GENRE et al., 2016), infecção parasitária pela tripanossomíase humana africana (COURTIN et al., 2013) e outras infecções

virais como, por exemplo, vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HONG et al., 2015) e infecção pelo papiloma vírus (BORTOLOTTI et al., 2014).

Entretanto, além do polimorfismo de Del/Ins de 14-pb na região 3' UTR no gene HLA-G existem outras variações, denominadas Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs), que influenciam na expressão das isoformas proteicas desse gene, tais como: + 3003 C/T, + 3010C/G, + 3027 A/C, +3035 C/T, + 3142 C/G + 3187 A/G e + 3196 C/T.

Em relação ao SNP +3142 C/G, a presença de guanina (G) nessa posição aumenta a afinidade por microRNAs específicos (miR-148a, miR-148b e miR-152) que regulam a expressão deste gene negativamente, suprimem os mecanismos de tradução ou podem promover a degradação do RNAm (TAN et al., 2007; VEIT; CHIES, 2009; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; CASTELLI et al., 2009; HONG et al., 2015).

Os microRNAs são pequenas estruturas de RNA endógeno envolvida na regulação da expressão gênica pós-transcricional por induzir clivagem ou quebra do RNAm no processo de tradução (CHUA; ARMUGAN; JEYASEELAN, 2009; CASTELLI et al., 2009).

Segundo Martelli-Palomino e colaboradores (2013), em estudo realizado com brasileiros e franceses, os genótipos +3142 C/G e +3142 C/C estão relacionados com altos níveis de HLA-G solúvel, enquanto o genótipo +3142 G/G foi relacionado com níveis reduzidos de HLA-G. Entretanto, em estudo realizado em chineses portadores de Hepatite B crônica e HCC, também não foram encontradas diferenças estatísticas significantes quanto a relação do SNP +3142 C/G (ZHANG et al., 2012). Todavia, em mulheres africanas portadoras de HIV, foram avaliados os polimorfismos dos SNPs da região 3' não traduzida de HLA-G, porém não foram encontradas alterações estatisticamente significantes, em relação as frequências alélicas e genotípicas para o SNP +3142 C/G, em relação ao risco da transmissão materno fetal do HIV (HONG et al., 2015).

Dessa forma, apesar da relação do SNP +3142 C/G com os níveis de HLA-G solúvel, não foram encontradas alterações estatisticamente significantes nas frequências alélicas e genotípicas para o SNP +3142 C/G entre os pacientes portadores de hepatite B crônica e controles.

No que se diz respeito aos SNP, outra região importante é a +3187 A/G na região 3' UTR do gene HLA-G. Em relação ao polimorfismo de +3187 A/G, tem sido

relatado que este afeta a estabilidade do RNAm devido sua localização estar próxima a região rica em *motifs* Adenina/Uracila (*AU-rich motifs*) o que consequentemente diminui a meia-vida do RNAm de HLA-G, favorecendo sua degradação (YIE et al., 2008; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; HONG et al., 2015). Além disso, foi relatado que a presença do alelo +3187 A, foi associada com a diminuição da estabilidade do RNAm *in vitro*, levando assim a uma diminuição da expressão de HLA-G (YIE et al., 2008).

Estudos recentes têm relatado que a presença do alelo +3187 A foi associada com pré-eclâmpsia na população canadense (YIE et al., 2008) e com o Lúpus Eritematoso Sistêmico na região nordeste do Brasil (LUCENA-SILVA et al., 2013).

Acerca do polimorfismo do SNP +3187 A/G, o genótipo +3187 A/A avaliado em brasileiros e franceses foi relacionado a baixos níveis de isoformas solúveis de HLA-G em comparação aos indivíduos com genótipos +3187 A/G e G/G (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013). Aparentemente, esta região não influencia a ligação miRNA sobre a presença de ambos os sítios de variação polimórfica apesar de estar relacionada com a diminuição da expressão de HLA-G (CASTELLI et al., 2009). O presente estudo não encontrou diferenças significativas entre as frequências alélicas e genótípicas, de portadores de Hepatite B em comparação aos controles.

Outras variações de SNPs como + 3001 C/T, + 3003 C/T, + 3010 C/G, +3027A/C, +3035 C/T, presentes na região 3' UTR também podem influenciar na expressão de HLA-G através da afinidade por miRNAs (miR-513a-5p, miR-518c, miR-1262, miR 92a-1, miR 92a-2 e miR-661) (CASTELLI et al., 2009; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2016). Os miRNAs podem induzir clivagem ou quebra do RNAm no processo de tradução e consequentemente influenciar na expressão de HLA-G (CHUA; ARMUGAN; JEYASEELAN, 2009; CASTELLI et al., 2009)

Albuquerque e colaboradores (2016), mostraram que o alelo +3001T e genótipo +3001 C/T foram mais frequentes entre os pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1 quando comparado aos controles. A estrutura da região 3' UTR do HLA-G possui este alelo é a mesma da região 5-UTR (associada a baixos níveis das isoformas de HLA-G solúveis) (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2016).

Em relação à análise do genótipo +3001 C/T, os resultados de Albuquerque e colaboradores, (2016) corroboram com estudos populacionais em Portugal e Guiné-Bissau (ALVAREZ et al., 2009) e na população do nordeste brasileiro (LUCENA-SILVA et al., 2012).

A respeito do polimorfismo SNP +3003 C/T, também presente na região 3' UTR do gene HLA-G, recentemente foi demonstrado que o alelo +3003C e o genótipo C/C estão relacionados com uma maior suscetibilidade em desenvolver Lúpus Eritematoso Sistêmico (CATAMO et al., 2015). Neste contexto ainda em relação ao alelo +3003C e o genótipo +3003 C/T, estes foram associados com a maior suscetibilidade em desenvolver câncer de próstata (ZAMBRA et al., 2016). Contudo, o efeito biológico do alelo +3003C tem sido descrito que este tem relação com aumento da afinidade de miRNA para o RNAm do gene HLA-G, dessa forma diminuindo a acessibilidade do RNAm, consequentemente interferindo na síntese das isoformas de HLA-G (CATAMO et al., 2015). Em relação a presença do alelo +3003T, o mesmo possui elevada afinidade por alguns miRNAs e com baixa afinidade para outros (CASTELLI et al., 2009).

No entanto, ao analisar as frequências alélicas e genótípicas do SNP +3003 C/T da região 3' UTR do HLA-G observou-se diferenças entre os genótipos C/T e T/T nos controles em relação aos pacientes com Hepatite B. Dessa forma, é possível que esses genótipos estejam associados com uma menor suscetibilidade para desenvolver a forma crônica da hepatite B.

Os polimorfismos dos SNPs +3010 C/G, +3027A/C e +3035 C/T localizados na região 3' UTR foram associados com a expressão de HLA-G, todavia, as relações destes SNPs sobre a influência na atividade pós-transcricional da atividade do gene HLA-G ainda não foram bem estudados (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013). A presença de guanina (G) na posição +3142 foi observada por Tan e colaboradores (2007) como um marcador de suscetibilidade para o desenvolvimento de asma brônquica, no qual pode influenciar a expressão de HLA-G, aumentando a afinidade por miRNAs (miR-148a, miR-148b e miR-152). Estes miRNAs atuam diminuindo a disponibilidade de RNAm de HLA-G através da degradação e supressão dos mecanismos de tradução (ZHU et al., 2010; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013). A capacidade de ligação destes miRNAs podem fazer com que os mesmos atuem potencialmente em outros sítios polimórficos presentes na região 3' UTR, como os

SNPs nas posições +3003 C/T, +3010 C/G, +3027 A/C e +3035C/T, contribuindo assim para diminuição de RNAm de HLA-G (CASTELLI et al., 2009).

Indivíduos brasileiros e franceses que apresentaram os genótipos +3010 C/C, +3027 C/C e +3035 C/C e C/T possuem níveis mais elevados de HLA-G solúvel em comparação com os demais genótipos desses polimorfismos (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013).

Em estudos acerca da relação dos SNPs da região 3' UTR em diversas situações clínicas estão sendo amplamente abordados como, por exemplo, em estudo em mulheres portadoras de pré-eclampsia, foi demonstrado que o genótipo +3027C/C em conjunto com o genótipo +3187G/G apresentaram risco relativo maior para desenvolver eclampsia (QUACH et al., 2014). Em doenças autoimunes, análise de indivíduos com Lúpus Eritematoso Sistêmico observou que o alelo +3035 T pode estar relacionado com um maior risco de desenvolver a doença quando comparada a indivíduos controles (CHEN et al., 2014). Albuquerque e colaboradores (2016), observaram que o genótipo +3010 C/C está associado a diminuição ou moderada produção das formas solúveis de HLA-G em pacientes portadores de Diabetes Mellitus Tipo I. Entretanto, genótipo +3010 G/G, foi associado ao aumento no risco de desenvolvimento de câncer de próstata (ZAMBRA et al., 2016).

Apesar das análises de polimorfismos dos SNPs +3010 C/G, +3027A/C e +3035 C/T não terem seu papel completamente esclarecido na influência da atividade pós-transcricional acerca da expressão de HLA-G (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013), observa-se a partir dos resultados encontrados nos estudos realizados até o presente momento, que estes SNPs possam exercer certa influência em situações clínicas diversas (QUACH et al., 2014; CHEN et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2016; ZAMBRA et al., 2016). Contudo, em nosso estudo não foram encontradas diferenças em relação as análises dos polimorfismos dos SNPs +3010 C/G, +3027A/C e +3035 C/T comparando pacientes portadores de Hepatite B e controles.

O polimorfismo SNP +3196 C/G está localizado próximo ao SNP +3187 A/G em uma região AU - *Rich motifs* na região 3' UTR do gene HLA-G (YIE et al., 2008) e podem regular a expressão de RNAm do gene HLA-G, além de ser um dos possíveis alvos de miRNAs (miR-148a, miR-148b e miR-152) (ALBUQUERQUE et al., 2016; CASTELLI et al., 2009). Porém os mecanismos envolvidos na influência

deste sítio polimórfico na atividade pós-transcricional do gene HLA-G ainda não foram esclarecidos (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2016).

Em estudo *in silico* realizado por Castelli e colaboradores (2009) não foram encontradas interações de miRNAs por esse sítio. Contudo, em estudo recente com brasileiros, o alelo +3196 G foi associado em pacientes portadores Lúpus Eritematoso Sistêmico, com uma maior suscetibilidade de apresentarem o quadro clínico de “*rash*” (lesão avermelhada que acomete as bochechas e dorso do nariz de forma simétrica), sugerindo por hipótese que esse alelo pode alterar a expressão do HLA-G, e pode estar envolvido com as alterações cutâneas dessa síndrome (CATAMO et al., 2015).

O alelo +3196 G está presente, entre os haplótipos mais frequentes (UTR-1, UTR-2, UTR-3, UTR-4, UTR-5, UTR-6 e UTR-7), apenas no haplótipo – 2 (UTR-2) composto pelos alelos ins 14-pb, +3003T, +3010C, +3027C, +3035C, +3142G, +3187A e +3196G na região 3’ UTR do gene HLA-G (CRISTOFARO et al., 2013; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; LUCENA-SILVA et al., 2013). Cristofaro e colaboradores (2013) relacionaram o haplótipo UTR-2 com baixos níveis de HLA-G solúvel na população francesa. Entretanto, Martelli-Palomino e colaboradores (2013), observaram que o haplótipo UTR-2 estava associado a uma expressão intermediária de HLA-G solúvel em comparação aos demais haplótipos em indivíduos franceses e brasileiros.

Acerca do SNP +3196 C/G, no grupo de pacientes portadores de Hepatite B, a presença do alelo +3916 G foi estatisticamente significativa em relação aos controles. Entretanto a presença do alelo +3916 C nos controles foi significativa em relação aos pacientes portadores de Hepatite B crônica. Em relação ao SNP +3196 C/G, a presença do genótipo +3196 C/C foi estatisticamente significativa nos controles comparado aos pacientes portadores de Hepatite B crônica.

Dessa maneira, o presente estudo pode contribuir com diversos aspectos relacionados a Hepatite B. Observamos que a cidade de São Mateus tem o maior número de casos notificados de hepatite B na região norte do Espírito Santo. As maiores taxas de notificação foram na faixa etária de 20-59 anos e do sexo feminino. A predominância de notificações no sexo feminino é possivelmente porque as mulheres tendem a procurar mais serviços de saúde, permitindo assim o diagnóstico. As principais formas de contato com o VHB foram tratamento dental, uso de medicamentos injetáveis, procedimentos cirúrgicos e múltiplos parceiros

sexuais, destacando desta forma, o não cumprimento das técnicas de biossegurança. Assim, comprovou-se que há um comprometimento na qualidade de vida da população, expondo-os a hepatite B e outras doenças. Esses achados indicam que os municípios da região norte do Espírito Santo necessitam de medidas públicas eficientes para reduzir os números de casos principalmente nos municípios mais afetados. Uma dessas medidas vem através da conscientização de medidas preventivas contra as formas de transmissão e da adesão ao tratamento disponível para os infectados com intuito de reduzirem suas cargas virais e consequentemente reduzir o risco de transmissão.

Nos estudos dos polimorfismos da região 3' UTR do gene HLA-G de portadores crônicos provenientes da região norte do Espírito Santo e da região centro-oeste do Brasil, mais especificamente do município de Cuiabá, Mato Grosso, encontramos que os genótipos +3003 C/T, +3003 T/T e +3196 C/C foram mais predominantes entre os controles, sugerindo uma possível relação desses genótipos com uma menor suscetibilidade em desenvolver a Hepatite B crônica.

Contudo, constatou-se que o genótipo Del/Ins de 14-pb e o alelo +3196 G foram mais frequentes entre os portadores de Hepatite B crônica, sugerindo uma possível relação com uma maior suscetibilidade em desenvolver Hepatite B crônica.

Dessa forma, nossa hipótese sugere que o genótipo DEL/INS de 14-pb e alelo +3196 G possivelmente influenciam, juntamente com a ação de citocinas que incluem o IFN- α , IL-10, GM-CSF, IL-2, e TGF- β como observado em modelo *in vitro* (MOREAU et al., 1999; YANG; GERAGHTY; HUNT, 1995; AMIOT; VU; SAMSON, 2015), a um aumento da produção de HLA-G no microambiente hepático favorecendo o escape viral e cronificação da doença, uma vez que células T específicas podem ser inibidas pelas isoformas do HLA-G (LESPORT et al., 2009; CAROSELLA et al., 2008) e por citocinas supressoras como a IL-10 e TGF- β (REHERMANN, 2013).

A inflamação crônica no fígado seguida da regeneração hepática e deposição de matrizes extracelulares ricas em fibras levam ao quadro clínico de Cirrose Hepática e em alguns casos com a persistência da infecção viral e inflamação induzem a hepatocarcinogênese levando ao HCC (REHERMANN, 2013).

Tendo em vista as características da infecção pelo Vírus da Hepatite B e suas complicações clínicas, notou-se que se trata de um grave problema de saúde pública. Os resultados encontrados mostram a importância desse estudo para as

pesquisas voltadas para portadores de Hepatite B crônica, assim, esse tema necessita ser mais bem estudado.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os números de indivíduos infectados com o vírus da Hepatite B mostraram-se elevados nos municípios da região norte do Espírito Santo, tendo em destaque as cidades de São Mateus, Jaguaré e Pedro Canário;
- A faixa etária de 20 a 59 anos e o sexo feminino foram os mais acometidos pela infecção do VHB;
- As principais formas de contato com o VHB foram através do uso de medicamentos injetáveis e tratamento dentário, demonstrando que as normas básicas de biossegurança não estão sendo aplicados nos procedimentos destes estabelecimentos de saúde em São Mateus-ES;
- Dentre os medicamentos mais utilizados para o tratamento da Hepatite B crônica destaca-se o fármaco Tenofovir;
- A maioria dos indivíduos consultados no CRE-SM apresentaram a forma crônica da Hepatite B, sendo que destes, apenas 5 desenvolveram quadro clínico de Cirrose Hepática;
- O genótipo Ins/Del de 14-pb na região 3' UTR do gene HLA-G foi mais frequente nos pacientes sendo associado com maior suscetibilidade em desenvolver Hepatite B crônica, concordando com dados descritos na literatura;
- A presença dos genótipos CT e TT no SNP +3003 C/T e CC no SNP +3196 C/G na região 3' UTR foi superior nos controles em relação aos pacientes com Hepatite B Crônica, sugerindo que este genótipo não está associado ao desenvolvimento da forma crônica da doença.
- O alelo +3196 G foi mais frequente nos portadores de Hepatite B quando comparado aos controles. Sua presença sugere susceptibilidade ao desenvolvimento de Hepatite B crônica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL OMAR, S. Y. et al. Genetic association between the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and the recurrent spontaneous abortions in Saudi Arabian women. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1–2, 2015.

ALBUQUERQUE, R. S. et al. Association of HLA-G 3' untranslated region variants with type 1 diabetes mellitus. **Human Immunology**, v. 77, n. 4, p. 358–364, 2016.

ALVAREZ, M. et al. HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. **International Journal of Immunogenetics**, v. 36, p. 361 -366, 2009.

AMIOT, L. et al. HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells. **Hum Immunol**, v. 59, n. 8, p. 524–528, 1998.

AMIOT, L. et al. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **National Institute Health**, v.68 (3), p.417-431, 2012.

AMIOT, L. et al. Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 245–252, 2014.

AMIOT, L.; VU, N.; SAMSON, M. Biology of the immunomodulatory molecule HLA-G in human liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 30, p. 1–8, 2015.

ANDERSEN, R. M. Revisiting the Behavioral Model and Access to Medical Care: Does It Matter? **American Sociological Association**, v. 36, n. 1, p. 1 – 10, 1995.

BAHRI R. et al. Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. **Journal Immunology**, v. 176, p. 1331–1339, 2006.

BATIREL, A. et al. Comparable efficacy of tenofovir versus entecavir and predictors of response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B: a multicenter real-life study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 153–159, 2014.

BAUMERT, T. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterol**, v. 13, n. 1, p. 82–90, 2007.

BEASLEY, R. Prevention of perinatally transmitted hepatitis b virus INFECTIONS WITH hepatitis b immune globulin and hepatitis b vaccine. **The Lancet**, v. 322, n. 8359, p. 1099–1102, nov. 1983.

BECK, J.; NASSAL, M. Hepatitis B virus replication. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 13, n. 1, p. 48–64, 2007.

BERNAL, W.M.D; WENDON, J.M.B. Acute Liver Failure. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, p. 2525 – 2534, 2013.

BLOCK, T. M.; RAWAT, S.; BROSGART, C. L. Chronic hepatitis B: A wave of new therapies on the horizon. **Antiviral Research**, v. 121, p. 69–81, 2015.

BORTOLOTTI, D. et al. Implication of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms in human papillomavirus infection. **Tissue Antigens**, v. 83, p. 113 - 118, 2014.

BORTOLOTTI D. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum sensing molecule N – (3 oxododecanoyl) – I – Homoserine – Lactone Induces HLA-G expression in Human Immune Cells. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 3918 – 3925, 2015.

BOYSON, J. E. et al. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 25, p. 16180–16185, 2002.

BRAGA, W. S. M. et al. Prevalência da infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 1, p. 35–46, 2004.

BRASIL. Boletim Epidemiológico das Hepatites virais, 2012. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Campanha de atualização da caderneta de vacinação (multivacinação) 2013. p. 8–10, 2013a.

BRASIL. Ministério da Saúde. 30 anos do PNI/CGPNI/DEVEP/SVS. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do Censo Demográfico. 2010.

BRASIL. Nota Técnica Conjunta nº 02/2013/CGPNI/DEVEP e CGDHRV/DST AIDS/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde, 2013b.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRENOL, C. V. et al. O papel do gene e da molécula HLA-G na expressão clínica das doenças reumatológicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 1, p. 75–91, 2012.

BRUGIÈRE, O. et al. Immunohistochemical Study of HLA-G Expression in Lung Transplant Recipients. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 6, p. 1427–1438, 2009.

BRUGUERA, M. Prevención de las hepatitis virales. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 24, n. 10, p. 649–656, 2006.

BRUNETTO, M. R. et al. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. **Journal of hepatology**, v. 10, n. 2, p. 258–261, 1990.

BRUSS, V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. **Virus Research**, v. 106, n. 2, p. 199–209, 2004.

BUENDIA M-A; NEUVEUT C. Hepatocellular Carcinoma. **Cold Spring Harbor Perspect in Medicine**, v. 5, 2015.

CACCIOLA, I. et al. Occult hepatitis virus infection in patients with chronic Hepatitis C Liver Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 1, p. 22 - 26, 1999.

CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862–4870, 2008.

CASTELLI, E.C. et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Human Immunology**, v. 70, p. 1020 – 1025, 2009.

CATAMO, E. et al. Non-classical MHC-I human leukocyte antigen (HLA-G) in hepatotropic viral infections and in hepatocellular carcinoma. **Human Immunology**, v. 75, n. 12, p. 1225–1231, 2014.

CATAMO, E. et al. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 85, p. 458 - 465, 2015.

CHAN, H. et al. A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 52, n. 4, p. 1232–1241, 2010.

CHANG, M.H. Hepatitis B virus infections. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 12, p. 160 – 167, 2007.

CHÁVEZ, J. H.; CAMPANA, S. G.; HAAS, P. Panorama da hepatite B no Brasil e no Estado de Santa Catarina. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 14, n. 2, p. 91–96, 2003.

CHISARI, F. V; ISOGAWA, M.; WIELAND, S. F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. **Pathologie-biologie**, v. 58, n. 4, p. 258–266, 2010.

CHEN, T. et al. Association of three polymorphisms in the 3' untranslated region of the HLA-G gene with systemic lupus erythematosus in a population from Yunnan. **Chinese Journal of medical genetics**, v. 31, p. 228 - 232, 2014.

CHU, C. M.; LIAW, Y. F. Predictive Factors for Reactivation of Hepatitis B Following Hepatitis B e Antigen Seroconversion in Chronic Hepatitis B. **Gastroenterology**, v. 133, n. 5, p. 1458–1465, 2007.

CHUA, J.H.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. MicroRNAs: biogenesis, function and applications. **Current opinion in molecular therapeutics**, v. 11, n. 2, p. 189 – 199, 2009

CLARKE K.R.; WARWICK R.M. Similarity-based testing for community pattern: the 2-way layout with no replication. **Marine Biology**, v. 118, p. 167-176, 1994.

CLEMENS, S. A. et al. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2000.

CONSIGLIO, C. R. et al. Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 6, p. 540–545, 2011.

COSTA, L. G.; PAULA, R. C. DE; IGNOTTI, E. Detecção de infecção pelo vírus da hepatite B nos municípios brasileiros segundo cobertura dos serviços de hemoterapia, no período de 2001 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 617–626, 2012.

COURTIN, D. et al. HLA-G 3' UTR-2 haplotype is associated with Human African trypanosomiasis susceptibility. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 1–7, 2013.

CRISTOFARO, J.D. et al. HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. **Human Immunology**, v. 74, p. 203 -206, 2013.

DA SILVA, I. M. A. F. Soroprevalência da infecção pelos vírus da hepatite B e D em dois municípios da região de Baixo Munim, Maranhão, Brasil. 2014. 129 f. Tese (Doutor em Ciência) – Programa de pós-graduação enfermagem em saúde pública, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

DAMAZIO S.M. et al. Parasitos intestinais em comunidades quilombola do Norte do Espírito Santo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 1 – 6, 2013.

DARINI, M.; GERBER, M. Letter: Hepatitis B antigen in vaginal secretions. **Lancet**, v. 2, p. 695-698, 1970.

DAVIS, J. P. Experience with hepatitis A and B vaccines. **American Journal of Medicine**, v. 118, n. 10, 2005.

DAVISON, F.; ALEXANDER, G.J.M.; TROWBRIDGE, R. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes of chronic HBSAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. **Journal Hepatology**, v. 4, p. 37–44, 1987.

DEGHAIDE, N.H. et al. Tumor necrosis factor region polymorphisms are associated with AIDS and with cytomegalovirus retinitis. **Aids**, v.23, n.13, Aug 24, p.1641-7. 2009.

DESCHASEAUX, F. et al. HLA-G in organ transplantation: Towards clinical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 397–404, 2011.

DIAS, F. C. et al. The role of HLA-G molecule and HLA-G gene polymorphisms in tumors, viral hepatitis, and parasitic diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. FEB, p. 2–11, 2015.

DJURISIC, S.; SØRENSEN, A.E.; HVIID, T.V. A fast and easy real-time PCR genotyping method for the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism in the 3' untranslated region. **Tissue Antigens**, v. 79, n. 3, p. 186 – 189, 2012.

DONADI, E. A. Como Entender a Nomenclatura E Os Mecanismos De Associação Entre Os Antígenos E Os Alelos De. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP**, v. 33, n. 1, p. 7–18, 2000.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 369–395, 2011.

EASL. European Association os Study Liver. Revised clinical practice guidelines on the management of chronic Hepatitis B, 2012

ENGHELABIFAR, M. et al. Association of the maternal 14-bp insertion/deletion polymorphism in the histocompatibility leukocyte antigen G gene with recurrent implantation failure. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 12, n. 9, p. 641 - 646, 2014.

ESKANDARI-NASAB, E. et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Cancer biomarkers: Section A Disease markers**, v. 13, n. 4, p. 253 - 259, 2013.

FATHIMOUGHADDAM, F. et al. The prevalence of hepatitis b antigen-positivity in the general population of Mashhad, Iran. **Hepatitis Monthly**, v. 11, n. 5, p. 346–350, 2011.

FATTOVICH, G. et al. Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years. **Gut**, v. 57, n. 1, p. 84–90, 2008.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. DA. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 473–487, 2004.

FIGUEIREDO, N.C. et al. Marcadores sorológicos do vírus da Hepatite B em mulheres jovens atendidas pelo Programa de Saúde da Família em Vitória, Estado do Espírito Santo, 2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 590-595, 2008.

FOCACCIA, R. et al. Estimated prevalence of viral hepatitis in general population of the municipality of Sao Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. **Brazilian Jornal of Infectious Diseases**, v 2, p. 269-84, 1998.

FOCACCIA, R. et al. Prevalência das Hepatites Virais em São Paulo. In. Focaccia, R. **Tratado das Hepatites Virais**. São Paulo: Atheneu, p. 3-10, 2003.

FONSECA, J. C. F. História natural da hepatite crônica B Natural history of chronic hepatitis B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 672–677, 2007.

FONSECA, J. C. F. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322–330, 2010.

FUNG, J. et al. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2715–2725, 1 dez. 2011.

FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA. Carlos Araújo da Costa - CRF-RJ 2809. Rio de Janeiro [2016]: Fiocruz/Farmanguinhos. Bula de Remédio.

GANEM, M.D.; PRINCE, A.M. Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. **The New England Journal of medicine**, v. 350, p. 118-1129, 2004.

GE, Y.Z. et al. Association between human leukocyte antigen-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and cancer risk: a meta-analysis and systematic review. *Human Immunology*, v. 75, p. 827–32, 2014.

GENRE, J. et al. HLA-G 14-bp Ins/Ins Genotype in Patients Harboring Helicobacter pylori Infection: A Potential Risk Factor? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 1, p. 52–57, 2016.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9145–9149, 1987.

GERASIMOU, P. et al. HLA-G 14-bp polymorphism affects the age of onset in Type I Diabetes Mellitus. **International Journal of Immunogenetics**, v. 43, n. 3, p. 135–142, 2016.

GISH, R. G. et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. **Antiviral Research**, v. 121, p. 47–58, 2015.

GOBIN, S. J. P.; VAN DEN ELSEN, P. J. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F and HLA-G. **Human Immunology**, v. 61, n. 11, p. 1102–1107, 2000.

GOMEZ, F. et al. Genetic variation and adaptation in Africa: Implications for human evolution and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, 2014.

GOMES-GOUVÊA, Michele Soares. Prevalência de resistência primária aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite B entre pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite B não submetido ao tratamento. 2014. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Ciências em Gastroenterologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

GONZÁLEZ, Ñ. et al. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 49, n. 3, p. 63–84, 2012.

GONZALEZ-HERNANDEZ, A. Linking Two Immuno-Suppressive Molecules: Indoleamine 2,3 Dioxygenase Can Modify HLA-G Cell-Surface Expression. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p. 571–578, 2005.

GROB, P. Hepatitis B vírus, pathogenesis and treatment. **Vaccine**, v. 16, p. 11 – 16, 1998.

GUST, I. D. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. **Gut**, v. 38 Suppl 2, n. suppl 2, p. S18–S23, 1996.

HADZIYANNIS S. J. et al. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. **Hepatology**, v. 3, p. 656–662, 1983.

HAGHI, M. et al. 14-bp Insertion / Deletion Polymorphism of the HLA-G gene in Breast Cancer among Women from North Western Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 6155–6158, 2015.

HAN, Q. et al. Association of serum soluble human leukocyte antigen-G levels with chronic hepatitis B virus infection. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 14, n. 1, p. 35–43, 2014.

HANSEN, T. H.; BOUVIER, M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 7, p. 503–13, 2009.

HASHEMI, M. et al. Evaluation of HLA-G 14 bp Ins/Del and +3142G>C Polymorphism with Susceptibility and Early Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 1 - 7, 2016.

HATZAKIS, A.; MAGIORKINIS, E.; HAIDA, C. HBV virological assessment. **Journal of Hepatology**, v. 44, p. 71–GERA76, 2006.

HIBY, S. E. et al. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. **Tissue Antigens**, v. 53, n. 1, p. 1–13, 1999.

HONG, H. A. et al. Maternal human leukocyte antigen-G (HLA-G) genetic variants associate with in utero mother-to-child transmission of HIV-1 in Black South Africans. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 147–158, 2015.

HOU, J.; LIU, Z.; GU, F. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. **International Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 50–57, 2005.

HOURLANI, M. R. et al. Hepatitis B surface antigen in urine of hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 13, n. 4, p. 324–328, 1978.

HOURLFAR, M. K. et al. Sensitivity and specificity of anti-HBc screening assays - Which assay is best for blood donor screening? **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 31, n. 6, p. 649–656, 2009.

HUI, C. K. et al. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 395–401, 2007.

HVIID, T. V. F. et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, v. 55, n. 2, p. 63–79, 2003.

HVIID, T. V. F. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 209–232, 2006.

ICHIKI, Y. et al. T cell immunity in hepatitis B and hepatitis C virus infection: Implications for autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 2, p. 82–95, 2005.

IIKURA, M. et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. **Laboratory Investigation**, v. 87, p. 971 – 978, 2007.

IMGT. International Immunogenetics Projects. HLA-G nucleotide sequence alignments. Disponível em: <
https://raw.githubusercontent.com/ANHIG/IMGTHLA/Latest/alignments/G_nuc.txt>.
 Acessado em: 14 de julho de 2016.

IRWIN, G. R. et al. Hepatitis B antigen in saliva, urine, and stool. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 1, p. 142 – 145, 1975.

ISHIGAMI, S. et al. HLA-G Expression in Gastric Cancer. **Anticancer Research**, v. 2472, p. 2467–2472, 2006.

ISHITANI, A; GERAGHTY, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 9, p. 3947–3951, 1992.

JIANG, Y. et al. 3' UTR 14-bp Insertion/Deletion Polymorphism with Hepatocellular Carcinoma Susceptibility in a Chinese Population. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 12, p. 1027–1032, 2011.

JEONG, S. et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. **PLoS one**, v. 28, n. 9, p. 1 - 10, 2014.

JOSHI, A; KUMAR, A. Immunoprophylaxis of hepatitis B virus infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 19, p. 172 – 183, 2001.

KANEKU, H. Detection of soluble HLA-G and its correlation with kidney transplant outcome. **Clinical Transplants**, p. 447-454, 2006.

KARAYIANNIS, P. Hepatitis B virus: Old, new and future approaches to antiviral treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 761–785, 2003.

KIM, S.J. et al. Hepatitis B virus reactivation in B-cell lymphoma patients treated with rituximab: analysis from the Asia Lymphoma Study Group. **Europa Journal of Cancer**, v. 49, p. 3486 – 3496, 2013.

KIM, S.H. et al. Relationship between the HLA-G 14bp insertion/deletion polymorphism and susceptibility to autoimmune disease: a meta-analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15839 - 15847, 2015.

KOLLER, B. H. et al. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 2, p. 469–480, 1989.

KOMATSU, H. et al. Cellular immunity in children with successful immunoprophylactic treatment for mother-to-child transmission of hepatitis B virus. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 103, p. 1–10, 2010.

KOVATS, S et al. A class I Atigen, HLA-G, Expressed in Human Trophoblast. **Science**, v. 248, p. 220 - 223, 1989.

LAARIBI, A. B. et al. Association of an HLA-G 14-bp Insertion/Deletion polymorphism with high HBV replication in chronic hepatitis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 22, n. 10, p. 835–841, 2015.

LAFON, M. et al. Modulation of HLA-G Expression in Human Neural Cells after Neurotropic Viral Infections Modulation of HLA-G Expression in Human Neural Cells after Neurotropic Viral Infections. **Journal of Virology**, v. 79, n. 24, p. 15226–15237, 2005.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **Journal of viral hepatitis**, v. 11, n. 2, p. 97–107, 2004.

LEE, W. M. Hepatitis B Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 24, p. 1733–1745, 1997.

LEFEBVRE, S. et al. A Specific Interferon (IFN)-stimulated Response Element of the Distal HLA-G Promoter Binds IFN-regulatory Factor 1 and Mediates Enhancement of

This Nonclassical Class I Gene by IFN- β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 9, p. 6133–6139, 2001.

LE GAL, F. A. et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International Immunology**, v. 11, n. 8, p. 1351–1356, 1999.

LEIFELD, L. et al. Intrahepatic activation of caspases in human fulminant hepatic failure. **Liver International**, v. 26, n. 7, p. 872–879, 2006.

LEMAOULT, J. et al. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2040–2048, 2007.

LESPORT, E. et al. Human melanoma cell secreting human leukocyte antigen–G5 inhibit natural killer cell cytotoxicity by impairing lytic granules polarization toward target cell. **Human Immunology**, v. 70, n. 12, p. 1000–1005, 2009.

LIN, A.; YAN, W.H. Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Cancers: Roles in Immune Evasion, Metastasis and Target for Therapy. **Molecular Medicine**, v. 21, p. 782 - 791, 2015.

LLOVET, J. M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1907–1917, 2003.

LOCARNINI S. Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis. **Journal of Hepatology**, v. 39 p. 124-132, 2003.

LOK A. S. Chronic Hepatitis B. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 1682 - 1683, 2002.

LOK A. S. et al. Spontaneous hepatitis B e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. **Gastroenterology** v. 92 p. 1839 – 1843, 1987.

LOZANO, J. M. et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. **Aids**, v. 16, n. 3, p. 347–351, 2002.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012.

LUCENA-SILVA, N. et al. Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. **Immune Response Genetics**, v. 79, p. 272 - 278, 2012.

LUCENA-SILVA, et al. HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus in 2 Brazilian Populations. **The Journal of Rheumatology**, v. 40, n. 7, 2013.

LUKSAMIJARULKUL, P., KAEPAN, W.; KLAMPHAKORN, S. Hepatitis B virus sero-markers, hepatitis C virus antibody and risk behaviors among middle age and older Thai males. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 38, n. 1, p. 45-52, 2007.

MAHONEY, F. J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 2, p. 351–366, 1999.

MANI, M.H.; KLEINER, D. E. Liver biopsy findings in chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 49, n. 5, p. 61 - 71, 2009.

MANIATIS, T.; MUNRO, S. Expression cloning of the murine interferon gamma receptor cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 23, p. 9248-9252. 1989.

MARIANO, A. et al. Role of beauty treatment in the spread of parenterally transmitted hepatitis viruses in Italy. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 2, p. 216–220, 2004.

MARION, P.L. Use of animal models to study hepatitis B viruses. **Progress in Medicine Virology**, v. 35, p.43-75, 1988.

MARTELLI-PALOMINO, G. et al. Polymorphic Sites at the 3' Untranslated Region of the HLA-G Gene Are Associated with Differential hla-g Soluble Levels in the Brazilian and French Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

MAST, E. E.; ALTER, M. J.; MARGOLIS, H. S. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: A global perspective. **Vaccine**, v. 17, n. 13-14, p. 1730–1733, 1999.

MAYNARD, J. E. Hepatitis B: global importance and need for control. **Vaccine**, v. 8 Supl, p. S18–20; discussion S21–3, 1990.

MCMAHON B.J. et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 599 - 603, 1985.

MELCHIOR, R. et al. Desafios da adesão ao tratamento de pessoas vivendo com HIV/Aids no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 2, p. 87 – 93, 2007.

MELO-BRASIL, L. et al. Prevalência de marcadores para o vírus da hepatite B em contatos domiciliares no Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 565–570, 2003.

MENIER, C. et al. Human leukocyte antigen–G is expressed in advanced-stage ovarian carcinoma of high-grade histology. **Human Immunology**, v. 70, n. 12, p. 1006–1009, 2009.

MOREAU, P. et al. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. **Transplant Proc**, v. 33, n. 3, p. 2277–2280, 2001.

MOREAU, P. et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **International Immunology**, v. 11, n. 5, p. 803–811, 1999.

NARDI, F. et al. Soluble monomers, dimers and HLA-G-expressing extracellular vesicles: the three dimensions of structural complexity to use HLA-G as a clinical biomarker. **Immune Response Genectis**, v. 88, p. 77-86, 2016.

NARDOTO, E.; LIMA, H. História de São Mateus. 2. Ed. São Mateus: EDAL; p. 463, 2001.

NGUYEN, M. H.; KEEFFE, E. B. Chronic hepatitis B: early viral suppression and long-term outcomes of therapy with oral nucleos(t)ides. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 16, n. 3, p. 149–155, 2009.

NIEDERAU, C. Chronic hepatitis B in 2014: Great therapeutic progress, large diagnostic deficit. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 33, p. 11595, 2014.

OLIVEIRA, A.C.D.S; FOCACCIA, R. Survey of hepatitis B and C infection control procedures at manicure and pedicure facilities. **Brazilian Journal Infection Disease**, p. 502–507, 2010.

OLIVEIRA-SOUZA, D. M. B. et al. Upregulation of Soluble HLA-G5 and HLA-G6 Isoforms in the Milder Histopathological Stages of Helicobacter pylori Infection: A Role for Subverting Immune Responses? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 1, p. 38–43, 2016.

ONNO, M. et al. Modulation of HLA-G Antigens Expression by Human Cytomegalovirus: Specific Induction in Activated Macrophages Harboring Human Cytomegalovirus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6426–6434, 2000.

ONNO, M. et al. The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. **Human Immunology**, v. 41, n. 1, p. 79–86, 1994.

OSTAPCHUK, Y. O. et al. Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF- β in healthy donors and breast cancer patients. **Cellular Immunology**, 2015.

PABALAN, N. et al. Meta-analysis of the human leukocyte antigen-G (HLA-G) 14 bp insertion/deletion polymorphism as a risk factor for preeclampsia. **Tissue Antigens**, v. 86, n. 3, p. 186–194, 2015.

PARK, G. M. et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 3, p. 606–611, 2004.

PEREIRA, L.M.M.B., et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk actor differences among three regions in Brazil. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 2, p. :240-247, 2009.

POLLICINO, T.; RAIMONDO, G. Occult hepatitis B infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 688–689, 2014.

POLLICINO, T.; SAITTA, C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 20, p. 5951–5961, 2014.

QUACH et al. A combination of single nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region of HLA-G is associated with preeclampsia. **Human Immunology**, v. 75, n. 12, p. 1163–1170, 2014.

RAIMONDO, G. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 652–657, 2008.

REBMANN, V.; WAGNER, S.; GROSSE-WILDE, H. HLA-G expression in malignant melanoma. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 6, p. 422–429, 2007.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 3, p. 215–229, 2005.

REHERMANN, B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 859–68, 2013.

RIZZO, R. et al. HLA-G expression and regulation during *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **Future Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 363–373, 2016.

RIZZO, R. et al. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C/G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Human Immunology**, v. 73, n. 11, p. 1140–1146, 2012.

SADISSOU, I. et al. High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy. **Malaria journal**, v. 13, p. 312, 2014.

SAMAL, J.; KANDPAL, M.; VIVEKANANDAN, P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 142–163, 2012.

SAMUEL, C. E. Antiviral Actions of Interferons. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 778–809, 2001.

SCHMUNIS, G. A. et al. Safety of blood supply for infectious diseases in Latin American countries, 1994–1997. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 924–930, 2001.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B virus biology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 1, p. 51–68, 2000.

SHI, W. W. et al. Plasma soluble human leukocyte antigen-G expression is a potential clinical biomarker in patients with hepatitis B virus infection. **Human Immunology**, v. 72, n. 11, p. 1068–1073, 2011.

SHIROISHI, M. et al. Efficient Leukocyte Ig-like Receptor Signaling and Crystal Structure of Disulfide-linked HLA-G Dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 15, p. 10439–10447, 2006.

SHOUVAL, D. Hepatitis B vaccines. **Journal of hepatology**, v. 39, n. 1, p. 70 – 76, 2003.

SOLIER, C. et al. HLA-G unique promoter region: functional implications. **Immunogenetics**, v. 53, n. 8, p. 617-625, 2001.

SOUTO, F. J. D. et al. Liver HLA-G expression is associated with multiple clinical and histopathological forms of chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 2, p. 102–105, 2011.

SOUTO, F. J. D. et al. Soroconversão do anti-HBs após vacina contra hepatite B em doadores de sangue HBsAg-negativos, anti-HBc-positivos na rede pública de saúde, Mato Grosso, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 7, p. 205–211, 2006.

SZMUNESS W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. **Progress in Medical Virology**, v. 24, p. 40 – 69, 1978.

TAN, Z. et al. Allele-Specific Targeting of microRNAs to HLA-G and Risk of Asthma. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 4, p. 829–834, 2007.

TAUIL, M. D. C. et al. Mortalidade por hepatite viral B no Brasil, 2000-2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 472–478, 2012.

TE, H. S.; JENSEN, D. M. Epidemiology of Hepatitis B and C Viruses: A Global Overview. **Clinics in Liver Disease**, v. 14, n. 1, p. 1–21, 2010.

TEXEIRA, A.C. et al. The 14bp-deletion allele in the HLA-G gene confers susceptibility to the development of hepatocellular carcinoma in the Brazilian population. **Tissue Antigens**, v. 81, p. 408 - 413, 2013.

TIAN, Y et al. The amino Acid residues at positions 120 of 123 are crucial for the antigenicity of hepatitis B surface antigen. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2971-2978, 2007.

TORBENSON, M.; THOMAS, D. L. Review Occult hepatitis B. **The Lancet**, v. 2, p. 479–486, 2002.

TRÉPO, C.; CHAN, H. L. Y.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, p. 2053–2063, 2014.

TRIPATZIS, I. Australian antigen in urine na fezes. **The American Journal of Diseases of Children**, v.123, n. 4, p. 401 – 404, 1972.

VEIT, T.D.; CHIES, J.A. Tolerance versus immune response microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transplant Immunology**, v.20, n.4, Mar, p.229-31. 2009.

VEIT, T. D. et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 18, n. 5, p. 424–430, 2009.

VEIT, T. D. et al. HLA-G +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil. **Tissue Antigens**, v. 83, n. 4, p. 260–266, 2014.

VISO, A. T. R.; BARONE, A. A. Patogenia da Hepatite B e Delta. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 10, p. 11 - 14, 2006.

VIVEKANANDAN P. Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA. **Journal of Virology**, v. 84, p. 4321– 4329, 2010.

WANDS et al., Serial studies of hepatitis-associated antigen and antibody in patients receiving antitumor chemotherapy for myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. **Gastroenterology**, v. 68, p. 105-112, 1975.

WANG, X.; JIANG, W.; ZHANG, D. Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. **Tissue Antigens**, v. 81, n. 2, p. 108 - 115, 2013.

WANG, C.C.M.D. et al. Assessing the Durability of Entecavir-Treated Hepatitis B Using Quantitative HBsAg. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 111, p. 1286-1294, 2016.

WASTOWSKI, I. J. et al. HLA-G expression. in the skin of patients with systemic sclerosis. **The Journal of Rheumatology**, v. 36 p. 1230–1234, 2009.

WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection. n. April, p. 124, 2014.

WHO. Hepatitis B. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acessados em: 02/03/2015.

WIELAND, S. F.; CHISARI, F. V. Minireview Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses. **Journal of Virology**, v. 79, n. 15, p. 9369–9380, 2005.

WIENDL, H. HLA-G in the Nervous System. **Human Immunology**, v. 68, n. 4, p. 286–293, 2007.

WIENS et al. Perfil of users of drugs for the tratment of chronic hepatitis B avaiable through the Brazilian Public Heath System. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 16, p. 379 - 382, 2012.

WRIGHT, T. L.; LAU, J. Y. N. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 342, p. 1340–1344, 1993.

WRIGHT R. Type B hepatitis: progression to chronic hepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 9 p. 97–115, 1980.

YAN, W.-H. HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. **Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets**, v. 11, n. 1, p. 76–89, 2011.

YANG, Y.; GERAGHTY, D.E.; HUNT, J.S. Cytokine regulation of HLA-G expression in human trophoblast cell lines. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 29, p. 179–195, 1995.

YANG, D.; LI, Y.; SONG, J. Significance of detection of HBV-DNA na CMV-DNA by polymerase chain reaction in screening mothers' milk. **Hunan Yi He Da Xue Xue Bao**, v. 24, n. 1, p. 44-46, 1999.

YE, H., O. Hepatitis B and D. **Medicine (United Kingdom)**, v. 43, n. 10, p. 599–606, 2015.

YIE, S. M.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Human Reproduction**, v. 21, n. 10, p. 2538–2544, 2006.

YIE, S.M. et al. A single base-pair mutation in the 3' untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. **Molecular Human Reproduction**, v. 14. p. 649–653, 2008.

ZAMBRA, F.M.B. et al. Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia – the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk. **Immune Response Genetics**, v. 87, p. 79 - 88, 2016.

ZENG, D. et al. Risk of HBV transmission in neonates and HBV carriers after combination in immunoprphylaxis. **Progress in Obstetrics and Gynecology**, v. 15, n. 2, p. 125-127, 2006.

ZHANG, J. et al. Non-classical MHC-I genes in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma. **Immunogenetics**, v. 64, n. 3, p. 251–258, 2012.

ZHANG, L. et al. The study of transmission route of HBV from father to infant. **Zhonghua Chuaranbing Zazhi**, v. 12, p. 199 – 201, 1994.

ZHU, X.M. et al. Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytotoxicity in JEG-3 cells. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 202, p. 1 - 7, 2010.

ZIDI, I. et al. Association of HLA-G +3142 C>G polymorphism and breast cancer in Tunisian population. **Immunologic Research**, v. 64, n. 4, p. 961–968, 2016b.

ZIDI, I. et al. Nonclassical human leukocyte antigen (HLA-G, HLA-E, and HLA-F) in coronary artery disease. **Human immunology**, v. 77, n. 4, p. 325–9, 2016a.

ZUCCKERMAN, C. et al. Prevention of primary liver cancer. **The Lancet**, 1983.

10. ANEXOS

10.1 Parecer do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GÊNICOS DE HLA-G 3' UTR 14bp EM PACIENTES COM HEPATITE B E HEPATOCARCINOMA CELULAR

Pesquisador: João Alexandre

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 2

CAAE: 38398714.4.0000.5063

Instituição Proponente: Centro Universitário Norte do Espírito Santo-UFES

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 974.840

Data da Relatoria: 27/02/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma reanálise do projeto.

O presente estudo propõe avaliar os polimorfismos gênicos do HLA-G e relacioná-los com os achados epidemiológicos, laboratoriais e clínicos de pacientes diagnosticados com o vírus da Hepatite B. O entendimento dos mecanismos patogênicos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes que melhorem a qualidade de vida dos pacientes infectados pelo VHB auxiliando no seu prognóstico.

Para atingir as metas propostas, serão coletadas amostras de sangue de pacientes e controles, onde as mesmas serão processadas em laboratório e utilizadas na padronização de metodologias e desenvolvimento posterior das mesmas nas análises dos polimorfismos gênicos da molécula HLAG, visando principalmente a análise de polimorfismos gênicos de inserção/deleção (ins./del.) de 14 pares de bases nucleotídicas (pb) podem estar associados com diferenças no perfil das isoformas de HLA-G.

Endereço: Rodovia BR101 Norte, Km 60
Bairro: Litorâneo **CEP:** 29.932-540
UF: ES **Município:** SAO MATEUS
Telefone: (27)3312-1519 **Fax:** (27)3312-1510 **E-mail:** cep@ceunes.ufes.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
NORTE DO ESPÍRITO SANTO-
UFES**



Continuação do Parecer: 974.840

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a influência dos polimorfismos gênicos de genes que estão localizados dentro do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) como o HLA-G, buscando relacionar os mesmos com a patogenia da Hepatite B. Com isso auxiliar os serviços de saúde dos municípios do Espírito Santo a elaborarem melhores estratégias de forma a reduzir o número de casos e melhorar a qualidade de vida da população.

Objetivo Secundário:

- Realizar o levantamento do número dos casos notificados de Hepatite B, junto à superintendência regional de saúde local no município de São Mateus e das cidades vizinhas que fazem parte da região norte do Espírito Santo;
- Realizar o levantamento do número de casos notificados de Hepatite B em usuários do SUS, junto à superintendência estadual de saúde no município de Vitória – Espírito Santo, com o objetivo de avaliar o restante do estado;
- Analisar prontuários dos pacientes para obtenção das características clínicas e laboratoriais, além dos medicamentos que estão sendo utilizadas no tratamento;
- Coletar amostras biológicas nos indivíduos diagnosticados com o vírus da Hepatite B;
- Processamentos das amostras biológicas coletadas: separação de soro e plasma e extração de DNA;
- Avaliar os polimorfismos de genes situados dentro do MHC (HLA-G);
- Associar os polimorfismos de genes situados dentro do MHC (HLA-G) com os achados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, assim como risco de desenvolvimento de câncer;
- Analisar os fatores de risco locais/regionais com o número de casos apresentados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco estará relacionado somente ao procedimento de coleta de sangue, sendo informado pelo pesquisador que o mesmo será realizado em local apropriado e por profissional treinado.

Os benefícios estão diretamente relacionados aos sujeitos da pesquisa, sendo que os achados contribuirão para uma melhor qualidade de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de grande relevância, pois contribuirá para um melhor entendimento sobre a hepatite B na região. Além disso, os seus resultados poderão contribuir para um melhor tratamento da doença, bem como a sua prevenção.

Endereço: Rodovia BR101 Norte, Km 60	CEP: 29.932-540
Bairro: Litorâneo	
UF: ES	Município: SAO MATEUS
Telefone: (27)3312-1519	Fax: (27)3312-1510 E-mail: cep@ceunes.ufes.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
NORTE DO ESPÍRITO SANTO-
UFES**



Continuação do Parecer: 974.840

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos foram apresentados: Folha de rosto, TCLE, Declaração da instituição co-participante, projeto de pesquisa e regulamento do biorrepositório.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências:

1. Esclarecer os objetivos secundários, pois após análise do projeto de pesquisa anexado foi constatado que alguns objetivos são diferentes ou não foram inseridos na Plataforma - Atendido.
2. Esclarecer a forma pela qual os sujeitos com hepatite B serão recrutados para participar na pesquisa (Ex.: como serão abordado: se vai aguardar o paciente no CRE, se vai até o paciente ou se irá comunicar-se com ele), bem como pacientes do HEMOES (sadios)- atendido;
3. Elaborar o TCLE utilizado termos de fácil compreensão para os sujeitos da pesquisa, bem como adicionar informações de que haverá guarda do material biológico (esclarecendo o prazo de guarda conforme opção do Pesquisador - indeterminado ou por dez anos - BIOBANCO ou BIORREPOSITÓRIO); esclarecer ao participante que o cancelamento da autorização deve ser feita por escrito - Atendido.
4. Como se trata de um estudo em que haverá armazenamento de amostras de material biológico, esclarecer qual será a forma de armazenamento. Informar se será armazenado em biobanco ou biorrepositório de acordo com a Resolução CNS 441, de 12 de maio de 2011 - atendido;
5. Explicitar responsabilidades - Biobanco: responsabilidade da Instituição; Biorrepositório: gerenciamento da Instituição e responsabilidade do Pesquisador - Atendido.
6. Inserir no TCLE informações sobre o armazenamento, utilização e descarte do material biológico (itens 5, 6, 7, 8 da Res. 441), quer seja para BIOBANCO ou BIORREPOSITÓRIO - Atendido.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rodovia BR101 Norte, Km 60		
Bairro: Litorâneo		CEP: 29.932-540
UF: ES	Município: SAO MATEUS	
Telefone: (27)3312-1519	Fax: (27)3312-1510	E-mail: cep@ceunes.ufes.br



Edited with the trial version of
Foxit Advanced PDF Editor
To remove this notice, visit:
www.foxitsoftware.com/shopping

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
NORTE DO ESPÍRITO SANTO-
UFES**



Continuação do Parecer: 974.840

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Sr/a. Pesquisador/a,

a) Segundo a Resolução 466/2012 (CONEP/CNS), a eticidade da pesquisa implica em: assegurar aos participantes da pesquisa os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa (Título III, 1.n). Tal imperativo deve constar dos Projetos e devem ser previstas formas de tais benefícios;

b) De acordo com a Resolução 466/2012 (CONEP/CNS), o pesquisador deve apresentar Relatórios Semestrais de sua pesquisa (Título X, X.1, item 3, letra b), bem como Relatório Final (Regimento Interno do CEP/CEUNES, Art. 25*). Os Relatórios Parcial e Final devem ser enviados através da Plataforma Brasil (item 'enviar notificação', anexar o respectivo documento).

SAO MATEUS, 06 de Março de 2015

Assinado por:
Jair Miranda de Paiva
(Coordenador)

Endereço: Rodovia BR101 Norte, Km 60
Bairro: Litorâneo
UF: ES **Município:** SAO MATEUS

CEP: 29.932-540

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
NORTE DO ESPÍRITO SANTO-
UFES**



Continuação do Parecer: 974.840

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a influência dos polimorfismos gênicos de genes que estão localizados dentro do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) como o HLA-G, buscando relacionar os mesmos com a patogenia da Hepatite B. Com isso auxiliar os serviços de saúde dos municípios do Espírito Santo a elaborarem melhores estratégias de forma a reduzir o número de casos e melhorar a qualidade de vida da população.

Objetivo Secundário:

- Realizar o levantamento do número dos casos notificados de Hepatite B, junto à superintendência regional de saúde local no município de São Mateus e das cidades vizinhas que fazem parte da região norte do Espírito Santo;
- Realizar o levantamento do número de casos notificados de Hepatite B em usuários do SUS, junto à superintendência estadual de saúde no município de Vitória – Espírito Santo, com o objetivo de avaliar o restante do estado;
- Analisar prontuários dos pacientes para obtenção das características clínicas e laboratoriais, além dos medicamentos que estão sendo utilizadas no tratamento;
- Coletar amostras biológicas nos indivíduos diagnosticados com o vírus da Hepatite B;
- Processamentos das amostras biológicas coletadas: separação de soro e plasma e extração de DNA;
- Avaliar os polimorfismos de genes situados dentro do MHC (HLA-G);
- Associar os polimorfismos de genes situados dentro do MHC (HLA-G) com os achados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, assim como risco de desenvolvimento de câncer;
- Analisar os fatores de risco locais/regionais com o número de casos apresentados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco estará relacionado somente ao procedimento de coleta de sangue, sendo informado pelo pesquisador que o mesmo será realizado em local apropriado e por profissional treinado.

Os benefícios estão diretamente relacionados aos sujeitos da pesquisa, sendo que os achados contribuirão para uma melhor qualidade de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de grande relevância, pois contribuirá para um melhor entendimento sobre a hepatite B na região. Além disso, os seus resultados poderão contribuir para um melhor tratamento da doença, bem como a sua prevenção.

Endereço: Rodovia BR101 Norte, Km 60	
Bairro: Litorâneo	CEP: 29.932-540
UF: ES	Município: SAO MATEUS
Telefone: (27)3312-1519	Fax: (27)3312-1510 E-mail: cep@ceunes.ufes.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
NORTE DO ESPÍRITO SANTO-
UFES**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mapeamento Epidemiológico e Sorológico de Casos de Hepatite B no Município de São Mateus - ES

Pesquisador: João Alexandre

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19438113.2.0000.5083

Instituição Proponente: Centro Universitário Norte do Espírito Santo-UFES

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 439.272

Data da Relatoria: 18/10/2013

Apresentação do Projeto:

Trata este relato de Projeto já analisado com pendências.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo já tiveram contato com o vírus da Hepatite B (VHB), e que 325 milhões tornaram-se portadores crônicos. A hepatite B é uma das principais causas de hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular, levando a um grande número de óbitos anualmente. Tanto os fatores virais, bem como a resposta imune do hospedeiro, têm sido implicados na patogenia e no resultado clínico da infecção por HBV. Muitas cidades brasileiras, incluindo São Mateus-ES, se encontram localizadas em regiões com escassa infraestrutura de saúde. Portanto, um estudo aprofundado sobre o levantamento de casos de hepatite B, se torna necessário, pois, pesquisas voltadas para levantamento epidemiológico de casos, permitirão coleta de amostras permitindo o desenvolvimento de estudos futuros para compreensão da imunopatogênese do vírus, bem como medidas de prevenção para o controle da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar um diagnóstico epidemiológico da situação dos casos de hepatite B no município de São Mateus, Espírito Santo.

Endereço: Rodovia BR101 Norte, Km 60

Bairro: Litorâneo

CEP: 29.932-540

UF: ES

Município:

Telefone: (273)312-1519

Fax: (273)312-1510

E-mail: cep@ceunes.ufes.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
NORTE DO ESPÍRITO SANTO-
UFES**



Continuação do Parecer: 439.272

Objetivo Secundário:

- Levantamento epidemiológico de casos de Hepatite B no município de São Mateus-ES, assim como, região norte. - Criar um banco de DNA, soro e plasma de pacientes portadores de Hepatite B e indivíduos controles saudáveis; - Tipagem sorológica do HBsAg dos indivíduos suspeitos de portarem o Vírus da Hepatite B.; - Analisar a distribuição espacial da infraestrutura municipal instalada, UBS e dos atendimentos prestados; Analisar a área de cobertura das UBS comunitárias; - Analisar a densidade demográfica da população relacionando ao número de casos apresentados; - Analisar os fatores de risco locais com o número de casos apresentados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pacientes envolvidos no estudo não sofrerão nenhum risco a sua saúde, somente serão submetidos a um desconforto de um a picada de agulha para retirada do sangue, porém este procedimento será realizado por uma pessoa qualificada (Farmacêutico-Bioquímico com treinamento em coleta ou Enfermeira) e será realizada no ambulatório, portanto caso haja alguma complicação durante o procedimento, o paciente será prontamente atendido. Este estudo contribuirá para o conhecimento melhor da doença e auxiliar futuramente no desenvolvimento de terapias que melhorem a qualidade de vida destes pacientes, sendo que os mesmos terão a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento. Durante e após o término dos trabalhos de pesquisa, os pacientes serão devidamente acompanhados e terão a garantia de receber o esclarecimento de qualquer dúvida e informações atualizadas sobre o estudo. Os resultados destes exames serão publicados em revistas de trabalhos científicos, mas não serão identificados os nomes dos pacientes, sendo os resultados favoráveis ou não. Todos os resultados serão analisados em grupos sem citação dos nomes dos pacientes envolvidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apesar de já existir vacina e terapia medicamentosa, para Hepatite B. Portanto, um estudo aprofundado sobre esta doença se torna necessário já que os mecanismos patogênicos e a evolução da doença no organismo não estão completamente esclarecidos. Pesquisas voltadas para levantamento epidemiológico de casos auxiliarão no futuro, pois permitem a elaboração de estudos mais complexos, permitindo a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese do vírus, bem como medidas de prevenção se tomam essenciais para o controle da doença, melhorando a qualidade de vida das pessoas acometidas por esta patologia.

Pesquisa de grande relevância no cenário não só municipal mas também nacional, porém metodologia não fica clara, no que se refere ao recrutamento dos sujeitos da pesquisa.

Endereço: Rodovia BR101 Norte, Km 50		CEP: 29.932-540
Bairro: Litorâneo		
UF: ES	Município:	
Telefone: (273)312-1519	Fax: (273)312-1510	E-mail: cep@ceunes.ufes.br

Ministério da Educação
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller
Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

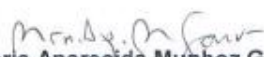
**TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA
DE PROJETO DE PESQUISA**

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 534/CEP-HUJM/08

"COM PENDÊNCIAS"	<input type="checkbox"/>
APROVADO "ad referendum"	<input type="checkbox"/>
APROVAÇÃO FINAL	<input checked="" type="checkbox"/>
NÃO APROVADO	<input type="checkbox"/>

O projeto de pesquisa intitulado: "**Avaliação do polimorfismo de deleção/inserção de 14 pb na molécula HLA-G em pacientes infectados com vírus da hepatite B e C,**" encaminhado pelo (a) pesquisador (a), **Carmen Lúcia Bassi** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 09/07/08 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 09 de Julho de 2008.


Profa. Dra. Maria Aparecida Munhoz Gaiva
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM

Hospital Universitário Júlio Müller
Rua L, SN, Jardim Alvorada, CEP 78048-790 Cuiabá - MT, Brasil
Fone: 65-3615-7254 e-mail: cephujm@cpd.ufmt.br
<https://www.ufmt.br/portal/ufmt>



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA
Av. Fernando Correa da Costa Nº 2.367
Bairro Boa Esperança,
Cuiabá-MT CEP: 78060-900 Bloco CCBS I
Fone: 0 55 65 3615 6240

Cuiabá, 15 de agosto de 2016.

Para

Prof. Dr. João Alexandre Trés Pancoto

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Espírito Santo

Prezado colega,

Autorizo a utilização das amostras de indivíduos infectados cronicamente com o vírus da hepatite B (HBV) e também de indivíduos não-infectados (controle), para utilização no estudo de polimorfismos da molécula HLA-G em seu laboratório.

Sem mais para o momento, despeço-me com votos de estima e consideração,


Carmen Lucia Bassi Branco

Professora adjunta do DCBS

Prof. Dra. Carmen L. Bassi Branco
Prof. Adjunta DCBS/FM/UFMT
Matrícula SIAPE 1488967

10.1 Artigo publicado na revista Anais da Academia Brasileira de Ciência



Anais da Academia Brasileira de Ciências (2016)
(Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150140>
www.scielo.br/aabc

Epidemiology of hepatitis B virus in the cities of the northern region of Espírito Santo, Brazil

ANDRÉ M. FONTES¹, JULIANA S. ARDISSON², MARCO A.A. SOUZA³,
RODRIGO R. FREITAS² and JOÃO A.T. PANCOTO¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Avenida Marechal Campos, 1468, Bairro Maruípe, 29043-900 Vitória, ES, Brasil

²Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Engenharia e Tecnologia, Rodovia BR 101 Norte, Km 60, Bairro Litorâneo, 29932-540 São Mateus, ES, Brasil

³Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências da Saúde, Rodovia BR 101 Norte, Km 60, Bairro Litorâneo, 29932-540 São Mateus, ES, Brasil

Manuscript received on February 24, 2015; accepted for publication on March 11, 2016

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) estimates that approximately 2 billion people worldwide have already had contact with hepatitis B virus (HBV) and 373 million have become chronic carriers. Hepatitis B is a major cause of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma, leading to a large number of deaths annually. Both viral factors and the host immune response have been implicated in the pathogenesis and clinical result of HBV infection. Many Brazilian cities, including the cities of the northern region of the state of Espírito Santo are located in regions with little health infrastructure. Our study performed an epidemiological analysis of cases of Hepatitis B in São Mateus, using methodology of Geographic Information System (GIS), aiming to raise the number of disease cases, establishing preventive measures to control the disease, improving the quality of life of people affected by this pathology. The city of São Mateus had the largest number of reported cases of hepatitis B northern region of Espírito Santo. The age group with the highest number of hepatitis B notifications was 20–49 years, mostly females. The major forms of contact with HBV in these cities were dental treatment, use of injectable medications, surgical procedures and multiple sexual partners.

Key words: hepatitis B, epidemiology, geoprocessing, Espírito Santo.

INTRODUCTION

The hepatitis B virus (HBV) is considered a prototype member of the family Hepadnaviridae which is incorporated by DNA viruses with liver tropism (Marion 1988). HBV is a major cause of infection in humans and it can cause acute and chronic hepa-

titis, cirrhosis, liver disease and hepatocellular carcinoma cell (Ganem and Prince 2004).

HBV transmission can occur through cuts (skin and mucosa), sexual contact, needles or other contaminated instruments, injecting drug use, blood transfusion, dental procedures or vertical transmission (through the placenta, at birth or during breastfeeding) (Ferreira and Silveira 2004).

Correspondence to: João Alexandre Trés Pancoto
E-mail: joao_pancoto@yahoo.com.br

Currently, it is estimated that about 2 billion people have had contact with HBV, and of this number, approximately 373 million people have become chronic carriers of the disease (WHO 2014).

The prevalence of hepatitis B varies from region to region in the world and can be classified as areas of high prevalence ($> 8\%$), intermediate ($2-8\%$) or low incidence ($< 2\%$) (WHO 2014). In South America, for example, the prevalence varies between 2% and 8% (Fathimoghaddam et al. 2011).

In Brazil, at least 15% of the population has, at some point, had contact with HBV and about 1% has chronic hepatitis B (Ferreira and Silveira 2004). The highest prevalence of HBV in Brazil is in the Amazon River basin (Torres 1996), but other regions, such as part of Espírito Santo and the western cities of Paraná and Santa Catarina, also have a high prevalence (Souto 1999).

Geoprocessing, a set of tools used to manage spatial information, can be applied to further clarify some epidemiological issues of HBV infection, as full details of actions and their consequences to public health can be obtained (Barcellos et al. 2008).

In addition, data from the Notifiable Diseases Information System (SINAN) can be used to study georeferencing. For example, Skaba et al. (2004) reviewed the addresses stored in the system in order to offer viable alternatives to the Geographic Information System (GIS) and thus contribute to viability, in country, of spatial analysis in health micro-areas such as the northern region of the Espírito Santo.

The cities in the northern region of the Espírito Santo are located in regions with irregular distribution of health services. In particular, the city of São Mateus has only a small referral hospital to serve the city and other nearby towns.

This study aimed to clarify the latest information on hepatitis B using an epidemiological survey of confirmed cases of hepatitis B and georeferencing in the city of São Mateus and the cities that are part of the northern region of the Espírito Santo.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the ethics committee of the Centro Universitário do Norte do Espírito Santo (CEUNES) at the Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), protocol number 439272/2013. The study complies with all ethical standards for research.

The study used data from eleven cities in the northern part of the Espírito Santo: Boa Esperança (population 14239), Conceição da Barra (pop. 28599), Ecoporanga (pop. 23153), Jaguaré (pop. 2572), Montanha (pop. 17899), Mucurici (pop. 5636), Nova Venécia (pop. 46262), Pedro Canário (pop. 23935), Pinheiros (pop. 24093), Ponto Belo (pop. 7034) and São Mateus (pop. 110453).

Information on individuals diagnosed with hepatitis B and treated at the Testing and Counseling Center (CTA) of the São Mateus health department were obtained from the Regional Office of County Health which provided access to the SINAN database.

Data of the SINAN database were compiled in Microsoft Excel 2013 and converted to proportion of total population in each city. The compiled data were subjected to statistical analysis in the statistical software *Primer* and the results were grouped by similarity.

To identify clusters of HBV we used hierarchical clustering similarity (Cluster) using the Bray-Curtis similarity index (Clarke and Warwick 1994) and non-metric multidimensional scaling (MDS). The hierarchical clustering linked the samples by their associations producing a dendrogram and a graph. The smaller the distance between the points, the greater the similarity between the samples (Moita Neto and Moita 1998). Another statistical test used was two-way ANOVA using *Graphpad Prism* software (version 1.5 CA, USA, 2000). To compare groups and other variables. These analyses were considered statistically different at $p < 0.05$.

RESULTS

The cities of São Mateus, Pedro Canário and Jaguaré, had proportionally the largest numbers of reported cases of HBV infection in the period 2007 to 2013 (Figure 1).

Similarity analysis showed that in 2009 the number of cases was significantly different from other years. In 2009 there was a similarity of only 40% with the other cities (Figure 2a). In 2013, there was a marked reduction in the number of cases, as evidenced by similarity of only 60% with other years (Figure 2a). Similarity of 80% of cases of hepatitis B in all analyzed cities was observed in the years 2007, 2008, 2010, 2011 and 2012.

The cities of São Mateus, Pedro Canário and Jaguaré had the highest numbers of reported cases of hepatitis B during the study period. The city of

São Mateus showed only 20% similarity with the other cities, and Pedro Canário and Jaguaré showed 80% similarity (Figure 2b).

The city of São Mateus had significantly more notifications than Jaguaré and Pedro Canário ($p < 0.03$) in the period 2009–2013. The cities of Jaguaré and Pedro Canário were also tested, however, statistically significant differences were found between the reports of numbers during the study period (Figure 3a).

When stratified by age, the 30–59 years age group were responsible for most hepatitis B notifications but there were no statistical differences between the cities of Jaguaré and Pedro Canário. However, in São Mateus there was a statistically significant difference compared with Jaguaré and Pedro Canário ($p < 0.0017$) (Figure 3b).

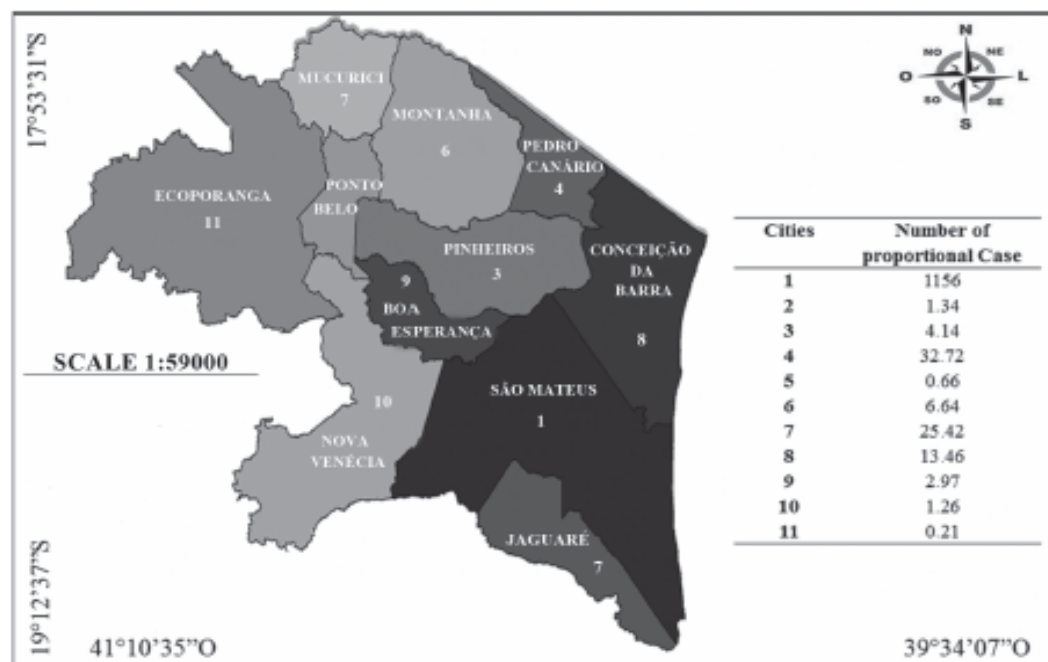


Figure 1 - Map of the northern region of the Espírito Santo.

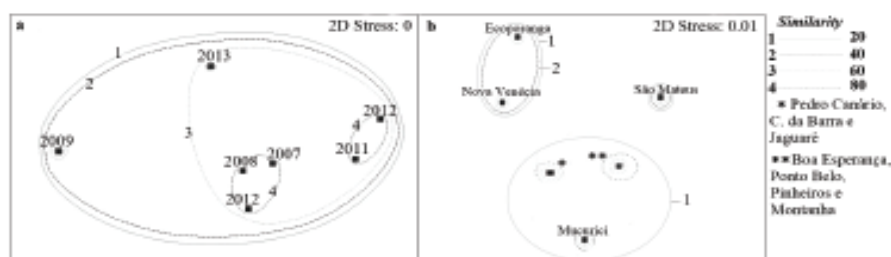


Figure 2 - Non Metric Multidimensional Scaling (MDS) – a) Similarity of the numbers of reported cases and cities in the Northern Region - ES as the profile of notifications in the years 2007 to 2013. b) Similarity of the cities in the Northern Region - ES as the profile of notifications in 2007 to 2013.

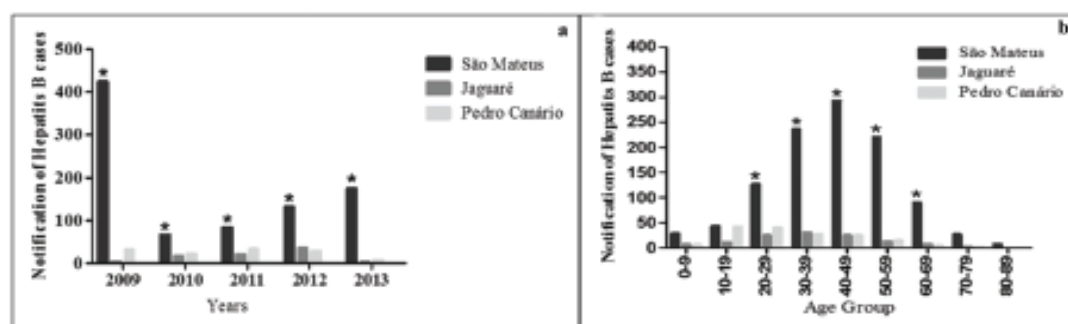


Figure 3 - Analysis between the notifications of Hepatitis B cases through the SINAN databases in the cities of the Northern Region of the Espírito Santo (São Mateus, Jaguaré and Pedro Canário). a) Number of reported cases from 2009 to 2013, * $p < 0.0313$. b) Number of reported cases of hepatitis B from 2007 to 2013 stratified by age group, * $p < 0.0017$.

Considering the three cities that had the highest numbers of cases of hepatitis B and gender (male and female), there were no significant differences between the cities of Pedro Canário and Jaguaré, however, similar to the analysis by age group, we found a statistically significant difference by gender between São Mateus and the other cities tested, $p < 0.01$ (Figure 4).

Finally, as the route of contact of individuals with HBV, it was found that the city of São Mateus has no similarity between the other cities in the northern region and the possible ways of transmission of hepatitis B. As seen in Figure 5, the main forms of contact with HBV were through the use of injectable drugs and dental treatment, with approximately 95% similarity between them

and through sexual and household contact with another carrier of HBV, with approximately 90% of similarity between them. Moreover, the form of contact with HBV in hemodialysis showed little similarity with other forms of contact, with only about 20%.

DISCUSSION

There are few studies regarding hepatitis B in Brazil and those that do exist refer to specific groups rather than the population in general (Ferreira and Silveira 2004). Espírito Santo is no different, so we did an epidemiological study to remedy the deficiency in studies of the disease in the north of the state.

Of all cities in the northern region of the state, three cities São Mateus, Pedro Canário and Jaguaré

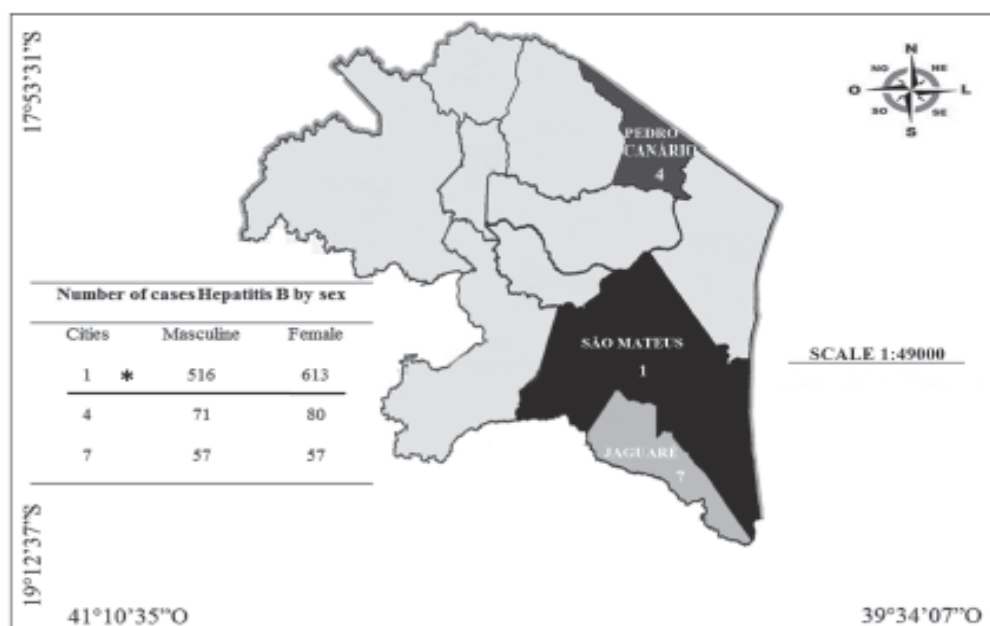


Figure 4 - Map of cities in the northern region had the highest number of notifications HBV stratified by gender.

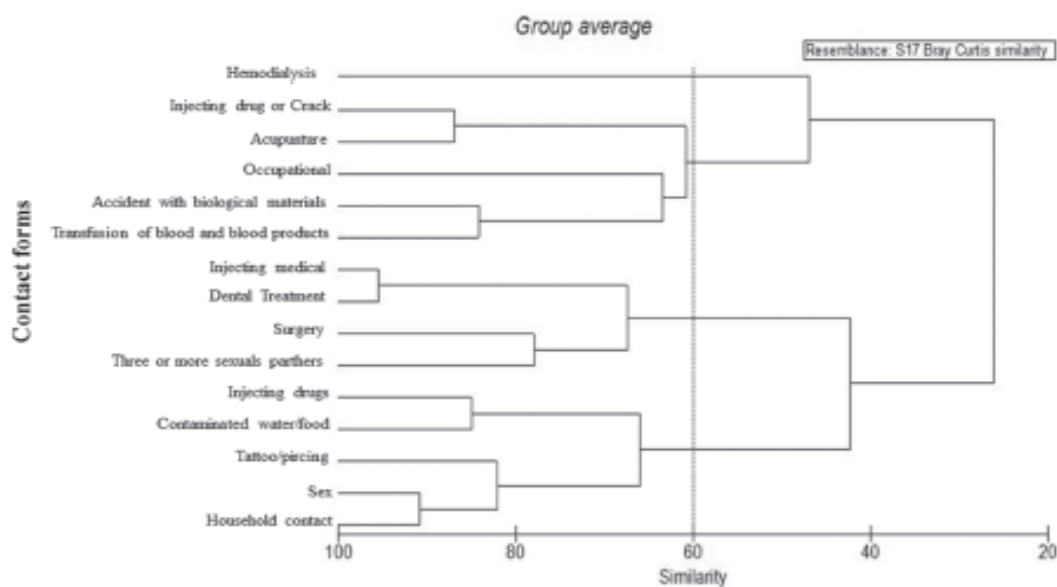


Figure 5 - Hierarchical Cluster Analysis - Dendrogram representing the contact forms of hepatitis in the cities of the Northern Region of the Espírito Santo and with timeline (2007-2013).

had significantly higher numbers of notifications of hepatitis B. This may be linked to an inefficiency of the reporting systems of the other cities as reported in Epidemiological Bulletin of Viral Hepatitis Ministry of Health (Brasil 2012), or a genuinely lower incidence of hepatitis B.

Even after converting numbers to proportions, the city of São Mateus had much higher incidence of hepatitis B than other cities (20% similarity). This may be because São Mateus hosts one of the headquarters of the Regional Health Superintendent of the State Health Secretariat of Espírito Santo and is considered a center of health administration in the north, as it performs all the dedicated care of the HBV cases from other cities.

The discrepancy between São Mateus and other cities may also be related to the fact the city has a blood bank. According to a study by Costa et al. (2012), all Brazilian regions with blood banks had a higher average rate of detection of hepatitis B than areas without this service because of greater access to laboratory diagnostics.

The greatest number of notifications was in the age group 30–59 years in the cities that had the highest number of cases, with 80% similarity between years. A study on the hepatitis B detection rate by age group and gender in Brazil and in the Southeast also found that the greatest number of cases occurred in the 30–59 year age group (Brasil 2012). Costa et al. (2012) observed that the age group most affected with hepatitis B varied by gender in Brazil, with greatest incidence in males aged 40–69 years and in women aged 15–39 years. These age groups are more likely to get hepatitis B because these age groups often have a lifestyle that has a high risk of transmission of HBV, particularly with respect to sexual activity and the number of partners (Chávez et al. 2003). Furthermore, the detection of hepatitis B between the ages of 1 and 14 years in Brazil has decreased possibly due to the inclusion of the vaccine against HBV in the calendar of the National Immunization Program in 1997 (Brasil 2012).

Our study of the northern state of Espírito Santo also analyzed the number of notifications of hepatitis B stratified by gender in the three cities with the highest number of cases. In these cities females had higher rates of hepatitis B notification than males, which clashes with national data in which males were responsible for the largest incidence of the disease in Brazil (Brasil 2012). Previously, Clemens et al. (2000) found that the difference between the genders was not significant in Brazil and in the Southeast. However, in our study, a significant difference was found ($p < 0.0106$) when comparing the city of São Mateus (highest number of notifications) with the cities of Pedro Canário and Jaguaré.

The main forms of contact with the virus in our study were through the use of injectable drugs and dental treatment, with approximately 95% similarity between them and the sexual way and the household contact with another with HBV, with approximately 90% of similarity between them. Moreover, the form of contact with HBV in hemodialysis showed little similarity with other forms of contact, with only about 20%.

In contrast to our results, a study by Brasil et al. (2003) demonstrated that of the total population studied in the state of Amazônia, 24.6% reported exposure to endemic area and 15.5% had percutaneous exposure before infection with HBV.

CONCLUSIONS

The city of São Mateus has the largest number of reported cases of hepatitis B in the northern region of Espírito Santo. The highest rates of notification of hepatitis B in the study area were in the age group 20–49 years, mostly females. The predominance of notifications in females is possibly because women tend to seek more health services, thus enabling diagnosis. The main forms of contact with HBV were dental treatment, use of injectable medications, surgical procedures and multiple sexual partners. Thus, we conclude

that there is an impairment in quality of life of the population under study, exposing them to hepatitis B and other diseases.

REFERENCES

- BARCELLOS C, RAMALHO W, GRACIE R, MAGALHÃES MAFM, FONTES MP AND SKABA D. 2008. Georreferenciamento de dados de saúde na escala submunicipal: algumas experiências no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 17: 59-70.
- BRAZIL. 2012. Ministério da Saúde (MS). Boletim epidemiológico das hepatites virais. Brasília: MS.
- BRASIL LM, FONSECA JCF, SOUZA RB, BRAGA WSM AND TOLEDO LM. 2003. Prevalência de marcadores para o vírus da hepatite B em contatos domiciliares no Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 26: 565-570.
- CHÁVEZ JH, CAMPANA SG AND HAAS P. 2003. Panorama da Hepatite B no Brasil e no estado de Santa Catarina. *Rev Panam Saúde Públ* 14: 91-96.
- CLARKE KR AND WARWICK RM. 2001. Change in Marine Communities, 2nd ed., United Kingdom: Primer-E, Plymouth Marine Laboratory, chapter 5, p. 1-9.
- CLEMENS SAC, FONSECA JCD, AZEVEDO T, CAVALCANTIA, SILVEIRA TR, CASTILHO MC AND CLEMENS R. 2000. Soroprevalência para hepatite A e B em quatro centros no Brasil. *Rev Soc Bra Med Trop* 33: 1-10.
- COSTA LG, PAULA RC AND IGNOTTI E. 2012. Detecção de infecção pelo vírus da hepatite B nos municípios brasileiros segundo cobertura dos serviços de hemoterapia, no período de 2001 a 2008. *Epidemiol Serv Saúde* 21: 617-626.
- FATHIMOOGHADDAM F, HEDAYATI-MOGHADDAM MR, BIDKHORI HR, AHMADI S AND SIMA HR. 2011. The prevalence of hepatitis B antigen-positivity in the general population of Mashhad, Iran. *Hepat Mon* 11: 346-350.
- FERREIRA CT AND SILVEIRA TR. 2004. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol* 7: 483-487.
- GANEM MD AND PRINCE AM. 2004. Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med* 350: 1118-1129.
- MARION PL. 1988. Use of animal models to study hepatitis B viruses. *Prog Med Virol* 35: 43-75.
- MOITA NETO JM AND MOITA GC. 1998. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim Nova* 21: 467-469.
- SKABA DA, CARVALHO MS, BARCELLOS C, MARTINS PC AND TERRON SL. 2004. Geoprocessamento dos dados da saúde: o tratamento dos endereços. *Cad Saúde Pública* 20: 1753-1756.
- SOUTO FJD. 1999. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *Gastro Endosc Dig* 18:143-150.
- TORRES JR. 1996. Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America. *Gut* 38: 548-555.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2014. Hepatite B. [Internet]. [Acessado 2014 jun 26]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.